ANNALES

DE L'INSTITUT PASTEUR

PARIS. — L. MARETHEUX, IMPRIMEUR, 1, RUE CASSETTE.

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

PAR

E. DUCLAUX

COMITÉ DE RÉDACTION

Dr **CALMETTE**, directeur de l'Institut Pasteur de Lille ;
Dr **CHANTEMESSE**, professeur à la Faculté de Médecine ;
Dr **LAVERAN**, membre de l'Institut de France ;
Dr **L. MARTIN**, directeur du service de Sérothérapie ;
Pr **METCHNIKOFF**, sous-directeur de l'Institut Pasteur ;
Dr **ROUX**, directeur de l'Institut Pasteur ;
Dr **VAILLARD**, membre de l'Académie de Médecine.

TOME VINGT-HUITIÈME

1914

AVEC 20 PLANCHES

PARIS

MASSON ET Cie, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, Boulevard Saint-Germain (6e).

28e ANNÉE JANVIER 1914 N° 1

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ACTIVATION DE LA TOXINE TÉTANIQUE

par A. MARIE.

Nous avons montré (1) qu'un produit normal de l'organisme, l'adrénaline, exerce *in vitro* une action puissante sur la toxine tétanique dont plusieurs millions de doses mortelles peuvent être neutralisées par un gramme de cet alcaloïde. En outre, nous avons vu que si on remplace celui-ci par de la poudre de surrénale, le nouveau mélange conserve toutes ses propriétés tétanisantes, même avec des quantités de glande desséchée représentant une dose notable d'adrénaline. Bien plus, il suffit d'ajouter cette poudre de capsule ou bien d'autres préparations de l'organe au mélange toxine-adrénaline pour empêcher l'action antitétanique d'un échantillon de suprarénine, naturelle ou synthétique.

Ce fait que la tétanotoxine n'est plus neutralisée par l'alcaloïde en présence des autres substances contenues dans la glande surrénale n'est pas spécifique : des extraits de tissu hépatique, des filtrats de matière nerveuse, enfin des corps définis tels que la lécithine présentent un pouvoir analogue et il est possible qu'il soit dû en partie à un composé comme la lécithine, si répandu dans les éléments cellulaires des glandes surrénales en particulier, ou bien à l'une de ses combinaisons.

En tout cas, c'est là un phénomène intéressant et que l'on pourrait interpréter dans le sens d'une action favorisante exercée sur la toxine tétanique par certaines substances de l'organisme. Cette hypothèse nous a fait rechercher ce qui se passe-

(1) Ces *Annales*, t. XXVII, p. 293.

rait si l'on faisait agir différents composés organiques sur des doses de tétanotoxine qui, administrées seules en injection sous-cutanée à des mammifères, ne provoquent plus chez eux la moindre trace de tétanos local.

Nos premiers essais ont porté sur l'action de diverses préparations de glandes surrénales, de lécithine et de cholestérine. Voici quelques-unes de ces expériences. (Tableau I.)

TABLEAU I.

Action de quelques préparations sur des doses subtétanisantes de toxine.

MÉLANGES INJECTÉS après une exposition de 20 heures à 37 degrés.	JOURS						
	1	2	3	4	5	6	7
Souris 1. TT. 0,005 c.c. + V gouttes de glycérine pure.	—	=	=	≡	+	»	»
Souris 2. TT. 0,0001 c.c. + V gouttes de glycérine . .	0	0	0	0	0	0	0
Souris 3. TT. 0,0001 c.c. + V gouttes de glycérolé de surrénale	—	=	≡	≡	≡	≡	≡
Souris 4. TT. 0,00001 c.c. + V gouttes de glycérine.	0	0	0	0	0	0	0
Souris 5. TT. 0,00001 c.c. + V gouttes de glycérolé de surrénale.	—	—	=	=	=	=	=
Souris 6. TT. 0,000001 c.c. additionné de traces d'une émulsion de lécithine	—	=	≡	≡	≡	≡	+

Ainsi, il résulte de cette première série d'essais que, dans certains cas, des préparations de glande surrénale, de lécithine, ont paru se comporter *in vitro* comme des substances favorisant l'action tétanigène de la toxine, puisqu'une quantité de ce poison cinq mille fois plus faible que la dose mortelle a, par suite de son mélange avec elles, provoqué des signes de tétanos intense chez la souris. L'action de la glande surrénale était particulièrement suggestive, car malgré sa teneur en adrénaline, des doses aussi minimes de toxine se trouvaient en quelque sorte mises en valeur par d'autres substances contenues dans la surrénale.

Toutefois c'est l'impossibilité de les séparer de l'adrénaline sans les altérer elles-mêmes qui nous a fait essayer d'autres

composés, comme la lécithine. Là encore, l'inconstance des résultats fut manifeste avec plusieurs échantillons d'un produit dont la fabrication pouvait avoir modifié quelques-unes des propriétés ; aussi, dans les autres expériences, avons-nous opéré avec le vitellus (1) de l'œuf de poule, qui nous a donné des résultats constants et particulièrement intéressants. (Tableau II.)

TABLEAU II.

Action du vitellus de l'œuf de poule sur des doses subtétanisantes de toxine.

MÉLANGES INJECTÉS 20 heures après leur préparation.	JOURS							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Souris 1. TT. 0,005 c.c.	—	=	≡	≡	+	»	»	»
Souris 2. TT. 0,0001 c.c.	0	0	0	0	0	0	0	0
Souris 3. TT. 0,000001 c.c. + VIII gouttes de vitellus.	0	=	≡	≡	≡	≡	+	»
Souris 4. TT. 0,0000001 c.c. + VIII gouttes de vitellus	0	=	=	≡	≡	≡	+	»
Souris 5. TT. 0,00000001 c.c. + VIII gouttes de vitellus	0	—	—	=	≡	≡	≡	+
Souris 6. TT. 0,000000001 c.c. + VIII gouttes de vitellus	0	0	0	—	=	=	=	=
Souris 7. Vitellus X gouttes	0	0	0	0	0	0	0	0

L'action de ce vitellus sur la tétanine s'est montrée d'une puissance très grande : des quantités de toxine cent mille fois inférieures à la dose qui par elle seule ne donne pas la moindre roideur de la patte inoculée, provoquent un tétanos local tout à fait net quand elles ont été mélangées avec une minime quantité de jaune d'œuf; un cent-millionième de centimètre cube de toxine additionné de cette substance suffit encore pour donner à une souris de 15 grammes un tétanos mortel en huit jours, alors que le témoin n'éprouve aucun trouble apparent avec un dix-millième de centimètre cube de toxine, c'est-à-dire avec une dose dix mille fois plus forte.

(1) Le jaune d'œuf était émulsionné dans son volume d'eau physiologique.

Dans le contenu de l'œuf, le blanc n'a aucun pouvoir favorisant sur la toxine; seul le vitellus se montre actif.

Si l'on se demande auquel de ses composants il doit cette propriété, il semble qu'on puisse l'attribuer surtout à ses combinaisons phosphorées organiques, c'est-à-dire aux lécithines. En effet, au moyen de solutions salines étendues, on ne parvient pas à extraire dans le jaune d'œuf, de substance activante pour la toxine, ce qui élimine l'ovovitelline ; de plus le chauffage du vitellus à 56 degrés pendant vingt minutes n'altère pas sensiblement son action sur la toxine. Si, d'autre part, on se rappelle le pouvoir favorisant que nous avons déjà constaté avec certaines lécithines du commerce, ainsi que l'exemple des venins, on ne peut s'empêcher d'attribuer à une lécithine ou à l'une de ses combinaisons une part importante dans le phénomène que nous étudions et dont l'intensité semble due à l'état naturel sous lequel se trouve la substance activante (1).

Mais, si c'est une lécithine qui intervient pour mettre en valeur des quantités aussi faibles de toxine tétanique, il n'en résulte pas une combinaison analogue aux lécithides. Il se fait cependant une fixation du poison sur la substance activante, cela plus rapidement à 37 degrés qu'à la température de la chambre et la filtration des mélanges vitellus-toxine rend un liquide dépouillé des propriétés tétanisantes qu'ils présentaient avant cette opération.

L'activation de la toxine tétanique par le vitellus de l'œuf de poule réussit surtout chez les espèces très sensibles à ce poison, comme la souris, le cobaye. Chez le lapin, qui jouit d'un état d'immunité naturelle assez marqué vis-à-vis de la tétanotoxine, on ne parvient pas à rendre actives des doses du poison très inférieures à celles qui lui donnent un tétanos par injection intramusculaire. (Tableau III.) D'ailleurs, chez la souris, une injection de vitellus n'a pas pour effet d'activer une dose subtétanisante de toxine inoculée séparément et à distance du premier.

Nous ajouterons que le pouvoir activant du jaune d'œuf sur la tétanine se manifeste uniquement en mettant en valeur des

(1) Une préparation comme l'*huile d'œufs*, obtenue en traitant les jaunes durcis par l'éther, se montre tout à fait inactive vis-à-vis de doses subtétanisantes de toxine, malgré la lécithine que contient cette préparation du Codex.

TABLEAU III.

Doses subtétanisantes de toxine.

MÉLANGES INJECTÉS 20 heures après leur préparation.	JOURS 1	2	3	4	5	6	7	8
Souris 1. TT. 0,0000001 c.c. + VIII gouttes blanc d'œuf.	0	0	0	0	0	0	0	0
Souris 2. TT. 0,00000001 c.c. + VIII gouttes jaune d'œuf	0	0	—	=	=	=	=	=
Souris 3. TT. 0,00000001 c.c. + VIII gouttes jaune d'œuf préalablement chauffé à 56 degrés pendant vingt minutes	0	0	—		=	=	=	=
Souris 4. TT. 0,00000001 c.c. + XX gouttes huile d'œufs	0	0	0	0	0	0	0	0
Souris 5. TT. 0,0000001 c.c. + VIII gouttes jaune d'œuf	0	0	—	=	=	=	=	= +
Souris 6. TT. 0,0000001 c.c. dans une patte, et VIII gouttes jaune d'œuf dans l'autre	0	0	0	0	0	0	0	0
Lapin 50 (1.580 grammes). TT. 0,001 c.c. + VIII gouttes jaune d'œuf	0	0	0	0	0	0	0	0

doses inactives par elles seules, non en diminuant la période d'incubation ou en changeant l'évolution de l'intoxication tétanique. Il suffit, pour s'en assurer, d'injecter à un cobaye le mélange vitellus-toxine directement dans le cerveau : le même espace de temps s'écoulera avant l'apparition des premiers signes du tétanos cérébral que chez l'animal témoin.

On n'observe pas non plus de changement dans l'évolution de la maladie, suivant qu'une dose *forte* de toxine tétanique a été injectée, mélangée ou non avec le vitellus d'œuf.

Les faits que nous venons d'étudier montrent que la quantité de toxine tétanique agissant sur le neurone doit être extrêmement petite, la majeure partie étant neutralisée dans l'organisme, peut-être par l'adrénaline (1), au niveau des capsules surrénales. De plus, ces faits autorisent à penser que des composés lécithiniques ne sont pas étrangers au mécanisme de l'action du poison sur la cellule nerveuse.

29 octobre 1913.

(1 Ces *Annales*, t. XXVII, p. 294.

ACTION DES ABCÈS DE FIXATION SUR LA TRYPANOSOMIASE EXPÉRIMENTALE DU COBAYE ET SUR SON TRAITEMENT PAR L'ATOXYL

par A. CIUCA (de Bucarest).

(Travail du laboratoire de M. le professeur F. Mesnil.)

Les abcès de fixations produits par les substances chimiques, et spécialement par l'essence de térébenthine, sont employés depuis longtemps dans le traitement de diverses maladies infectieuses, dans le but d'aider l'action d'autres substances médicamenteuses ou d'obtenir par celles-ci une amélioration et quelquefois une guérison complète de ces maladies.

Ce dernier effet a été souvent obtenu dans les maladies en imminence de suppuration.

« En ce qui concerne les maladies à protozoaires, l'action améliorante de ces abcès a été remarquée d'abord dans des cas de malaria, chez des individus ayant des abcès à la suite des injections sous-cutanées de sulfate de quinine. » (J. Carles) (1). On a constaté plus tard des effets semblables dans la piroplasmose canine.

Depuis ces premières observations, les abcès térébenthinés ont été utilisés par Memmo, Adani et Martaglio (2) dans le traitement de la piroplasmose bovine.

Le Dr L. Martin (3) a remarqué, le premier, une amélioration considérable de la maladie du sommeil chez un homme de

(1) *Les abcès de fixation dans les maladies infectieuses et les intoxications*, p. 70, 1913. J.-B. Baillière et fils.

(2) *Annal. d'Ig. Experimenti*, 1905, p. 146 (Laboratoire séro-vaccinogène d'Erythrée).

(3) Les troubles cérébraux de la maladie du sommeil, leur traitement. *Bulletin médical*, p. 405, 10 mai 1911.

race blanche à la suite d'un abcès provoqué accidentellement par une injection sous-cutanée.

Plus tard, le même auteur eut des résultats inattendus dans un autre cas très grave, avec phénomènes cérébraux, en associant le traitement par l'atoxyl (à fortes doses), avec un abcès de fixation provoqué par l'essence de térébenthine.

La question n'étant pas étudiée au point de vue expérimental et étant donné, d'autre part, l'importance pratique de ces recherches, nous nous sommes décidés, à la suite des conseils de M. le professeur Mesnil, à entreprendre une série d'expériences dans cette direction.

Nous avions à répondre à ces deux questions :

1° L'essence de térébenthine, par l'abcès de fixation qu'elle provoque, peut-elle avoir une action antitrypanosomique et par conséquent être employée avec succès dans le traitement de la trypanosomiase expérimentale chez le cobaye ?

2° L'association du même abcès (provoqué toujours par la même substance) avec le traitement par l'atoxyl possède-t-elle un pouvoir curatif, dans la même trypanosomiase et chez le même animal ?

Nous avons choisi comme animal d'expérience le cobaye infecté avec le trypanosome du Surra ou avec celui de l'Ouganda (variété de Nagana).

Mais pour mieux suivre l'action de ces deux substances sur les trypanosomes *in vivo*, il fallait obtenir chez le cobaye une trypanosomiase très régulière comme évolution, avec beaucoup de trypanosomes dans le sang pendant la durée de la maladie et qui ne pourrait être guérie par l'atoxyl seul.

Ces conditions étaient réalisées chez les cobayes infectés avec le trypanosome de l'Ouganda. Les parasites, une fois apparus dans le sang, se maintenaient jusqu'à la mort en se multipliant progressivement ; de plus, d'après les recherches de MM. Laveran et Thiroux (1), cette trypanosomiase ou une voisine est inguérissable par l'atoxyl seul.

La trypanosomiase produite par le Surra étant très irrégulière comme évolution, nous l'avons abandonnée.

(1) Recherches sur le traitement des trypanosomiases. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXII, p. 97, 1908.

TECHNIQUE

Les trypanosomes employés sont depuis longtemps entretenus au laboratoire par des passages chez les souris.

Les passages par les cobayes n'exagèrent pas la virulence ni pour cette espèce, ni pour la souris.

Nous injections nos animaux par la voie péritonéale et ensuite on leur examinait journellement le sang. Dans les cas douteux, on notait les résultats après un examen de plusieurs préparations.

L'essence de térébenthine était employée telle qu'elle se trouve dans le commerce.

Nous provoquions la formation des abcès en injectant la térébenthine sous la peau de la fesse du côté externe et le plus haut possible pour éviter la gangrène de l'extrémité du pied, la diffusion du pus pendant la formation de l'abcès, et l'infection de celui-ci après l'ouverture.

Les cobayes injectés avec de la térébenthine sont extrêmement agités pendant une demi-heure. Après vingt-quatre heures, la région est chaude, très sensible et l'inflammation est assez forte; elle est au maximum à la soixante-douzième heure.

L'abcès se forme au bout de quatre ou cinq jours et il n'est pas toujours nécessaire de l'ouvrir.

Le pus est épais, d'une coloration blanc sale et il a une odeur forte de térébenthine, même quand on ouvre les abcès dix jours après l'injection.

Un abcès bien soigné est guéri en dix jours. D'ailleurs, on ne peut pas les entretenir longtemps parce qu'ils provoquent une forte cachexie des cobayes. Parmi les cobayes, il y en a qui supportent bien ces abcès, d'autres qui ne les supportent pas et d'autres chez lesquels on ne peut obtenir aucune inflammation locale.

La quantité d'essence de térébenthine injectée variait entre 1/2 et 1 cent. cube.

La solution d'atoxyl était faite quelques minutes avant l'injection au 100e, dans de l'eau distillée stérilisée.

On injecte l'atoxyl sous la peau et à la dose de 1 1/2-

2 cent. cubes; donc, les animaux reçoivent 0,015-0,020 gr. d'atoxyl.

L'efficacité thérapeutique de cette méthode était vérifiée par l'examen du sang avant et après les injections d'atoxyl et d'essence de térébenthine.

La disparition des trypanosomes de la circulation pendant le traitement était souvent contrôlée par l'inoculation à des souris neuves du sang des animaux soumis au traitement.

EXPÉRIENCES

Nos expériences ont porté sur 42 cobayes infectés avec le trypanosome de l'Ouganda et sur 10 cobayes infectés avec le trypanosome du Surra.

Sur les 42 premiers cobayes, 11 ont servi de témoins, les 31 autres ont été traités soit uniquement par l'essence de térébenthine, soit par l'association de cette substance et de l'atoxyl,

Sur les 10 derniers, 4 ont servi de témoins et les 6 autres ont été traités seulement par la térébenthine.

Chez les 11 témoins inoculés avec le trypanosome de l'Ouganda, la durée de la maladie a varié entre 11 et 56 jours, la moyenne étant de 30 jours. Les trypanosomes apparaissent dans le sang entre 3 et 8 jours.

Très rares au commencement, ils se multiplient progressivement jusqu'à la mort des animaux, qui présentent vers le 12e-14e jour des quantités considérables de parasites dans le sang. Il n'y a pas de vraie crise trypanolytique et même la diminution du nombre des trypanosomes est rare.

Chez les témoins inoculés avec le Surra, la durée de la maladie a varié entre 17 et 41 jours. Les trypanosomes apparaissent dans le sang du 5e au 9e jour après l'inoculation; ils se maintiennent jusqu'à la mort, présentant plusieurs périodes de diminution allant jusqu'à la disparition complète.

Chez les cobayes Surra, les trypanosomes ne sont jamais aussi nombreux que chez les cobayes Ouganda.

Les témoins ont toujours été choisis parmi les cobayes les plus forts de la série.

Les 37 autres cobayes soumis au traitement ont été groupés en deux catégories.

Catégorie A.

Cobayes traités seulement par l'*essence de térébenthine.*

Pour cette catégorie, nous avons deux séries d'expériences et deux trypanosomiases différentes.

Première série. — Les cobayes ont reçu une ou plusieurs injections de térébenthine. La première injection était toujours faite en même temps que le trypanosome pour voir d'abord l'influence de l'abcès sur la période d'incubation de la maladie, et ensuite son rôle curatif.

Voici les observations des cobayes injectés avec le *trypanosome d'Ouganda.*

Cobaye n° 1, 420 grammes, infecté le 1er juin et injecté en même temps avec 1 cent. cube de térébenthine. Le 4 juin, il avait déjà un gros abcès. Les trypan. ont apparu dans le sang le 14 juin (après 14 jours), et 5 jours après, les parasites étant assez nombreux, on fait la deuxième *injection d'essence de térébenthine* (1 cent. cube). Vingt-quatre heures après, les trypan. deviennent plus rares; le 11 juillet, ils recommencent à augmenter jusqu'à la mort, survenue le 25 *juillet* (14 jours). L'évolution totale de la maladie fut de 55 jours. *Autopsie* : Péritonite purulente.

Cobaye n° 2, 400 grammes, infecté le 8 juillet et injecté simultanément avec 1 cent. cube de térébenthine. Les 18 et 19 juillet (8 jours après), l'examen du sang montre de rares trypan. L'abcès est bien formé. Le 21 juillet, les trypan. disparaissent du sang circulant; le 28 juillet, ils réapparaissent pour augmenter progressivement jusqu'à la mort, survenue le 5 août. L'évolution complète de la maladie fut de 26 jours. A l'autopsie, on trouve une congestion intense de tous les organes. Hypertrophie de la rate.

Cobaye n° 3, 480 grammes, infecté le 25 juillet et injecté en même temps avec 1 cent. cube de térébenthine. Le 5 août, les trypan. apparaissent dans le sang en très petit nombre. Le 7 août, il succombe. *Autopsie* : Hémorragie intrapéritonéale déterminée par la rupture du foie.

Cobaye n° 4, 580 grammes, infecté le 25 juillet et injecté avec 1 cent. cube de térébenthine le même jour. Les 4 et 5 août, les parasites sont très rares; deux jours après, ils disparaissent. Ils réapparaissent le 11 août en petit nombre. Le lendemain, on fait une seconde injection de térébenthine. Pas de réaction locale. Le 14 août, mort. Evolution de la maladie, 20 jours. *Autopsie* : Pleurésie avec adhérences pulmonaires. Congestion du poumon.

On répète ces expériences avec des cobayes inoculés avec le *trypanosome du Surra.*

Cobaye n° 5, 525 grammes, infecté le 1er juin et injecté avec 1 cent. cube d'essence de térébenthine. L'abcès se forme quatre jours après. *Le 17 juin*, les trypan. apparaissent dans le sang et ils s'y maintiennent en nombre variable jusqu'à la mort, survenue le 28 juillet. Evolution de la maladie 56 jours. *Autopsie* : Congestion des organes. Hypertrophie de la rate.

Cobaye n° 6, 430 grammes, infecté le 1er juin et injecté simultanément avec 1 cent. cube de térébenthine. Cinq jours après, il avait un énorme abcès local. Le 11 juin, on le trouve mort. Pendant ces 10 jours, l'examen du sang a toujours été négatif. *Autopsie* : Congestion intense des organes.

Cobaye n° 7, 475 grammes, infecté et injecté en même temps avec 1 cent. cube de térébenthine le 8 juillet. 10 jours après, les trypan. apparaissent. Le 25, ils sont très nombreux; on pratique la deuxième injection de térébenthine (1 cent. cube). Le 30 juillet, à l'examen du sang, on n'observe plus de parasites. Le 1er août, ils réapparaissent et se multiplient jusqu'au 11 août. On pratique une troisième injection de térébenthine (1 cent. cube). Tout de suite après, et durant 5 jours encore, l'examen du sang reste négatif. Après cet intervalle, les parasites font de rares apparitions. Le cobaye maigrit de plus en plus à cause de ses abcès et, le 23 septembre, il est trouvé mort. Evolution de la maladie, 76 jours. *Autopsie* : Les organes sont très pâles. Phlegmon diffus de la fesse gauche.

Deuxième série. — Les cobayes en pleine évolution de la maladie reçoivent une seule injection de térébenthine. Le but de ces expériences était de voir le rôle exclusivement curatif des abcès de fixation.

Les cobayes sont infectés avec le *trypanosome de l'Ouganda.*

N° 8, 480 grammes, infecté le 1er juin. Les trypan. apparaissent 4 jours après. Le 19 juin, l'infection est au maximum; on pratique l'injection de térébenthine. Quatre jours après, ils diminuent considérablement pour augmenter de nouveau les jours suivants jusqu'à la mort, survenue le 7 juillet. Evolution de la maladie, 36 jours. *Autopsie* : Congestion viscérale.

N° 9, 450 grammes, infecté le 8 juillet. L'examen du sang est positif après 7 jours et, au bout de 17 jours, les parasites sont innombrables. On pratique à ce moment l'injection de 1 cent. cube de térébenthine. Les parasites commencent à diminuer le troisième jour après l'injection de térébenthine, sans toutefois disparaître complètement. L'animal succombe le 5 août. Evolution de la maladie, 28 jours. A l'autopsie, congestion intense de tous les organes.

N° 10, 290 grammes, infecté le 15 septembre; 6 jours après, apparition des parasites dans le sang et, le 14 octobre, ils sont en quantité énorme. On pratique le lendemain l'injection de térébenthine (1 cent. cube). Le nombre des trypanosomes diminue même après 24 heures. Les 4 jours suivants, les trypanosomes ont presque disparu. A partir du 20 octobre, ils commencent à augmenter jusqu'à la mort, survenue le 3 novembre. Durée de la maladie, 53 jours. *Autopsie* : Congestion pulmonaire intense. Rate hypertrophiée.

On fait les mêmes expériences avec des cobayes infectés par les *trypanosomes du Surra.*

N° 11, 500 grammes, infecté le 8 juillet; 4 jours après, l'examen du sang est positif; les parasites sont au maximum le 25 juillet. A cette date, il reçoit une injection de 1 cent. cube de térébenthine, sans qu'il s'ensuive

aucune réaction locale ou générale. On le trouve mort le 15 août. Evolution de la maladie, 38 jours. *Autopsie* : Congestion intense et hypertrophie de la rate et des capsules surrénales.

N° 12, 400 grammes, infecté le 25 juillet, présente des parasites après 3 jours; ils deviennent assez nombreux après 15 jours. Le 9 août, il reçoit une injection de térébenthine (1 cent. cube). Les parasites disparaissent entièrement pendant les 5 premiers jours qui suivent l'injection; ils réapparaissent de temps en temps et en très petit nombre jusqu'à la mort, survenue le 26 septembre. Evolution de la maladie, 63 jours. *Autopsie* : Congestion intense du poumon.

N° 13, 380 grammes, infecté le 11 août, l'examen du sang est positif 7 jours après. Après trente-quatre jours seulement, les parasites sont en assez grand nombre. Le 14 septembre, on lui injecte 1 cent. cube de térébenthine. Les trypan. étaient déjà très rares après vingt-quatre heures et, pendant les 5 jours qui suivent, on trouve à peine un trypan. pour 4 ou 5 champs microscopiques. Le 15 octobre, le cobaye est trouvé mort. Evolution de la maladie, 65 jours. *Autopsie* : Congestion intense des organes parenchymateux.

Les témoins de ces deux séries sont au nombre de 9 : 5 pour les cobayes infectés avec le trypanosome de l'Ouganda et 4 pour ceux infectés avec le trypanosome du Surra.

a) *Témoins avec Ouganda* :

N° 14, 540 grammes, infecté le 25 juillet. Après 8 jours, les trypan. apparaissent dans le sang, et ils se multiplient progressivement jusqu'à la mort de l'animal (le 2 août). Evolution de la maladie, 17 jours. *Autopsie* : Congestion des organes parenchymateux avec hypertrophie de la rate.

N° 15, 500 grammes, infecté le 1er juin. L'examen du sang est positif 5 jours après l'inoculation. Pendant toute la durée de la maladie, les trypan. ont été très nombreux jusqu'à la mort (le 26 juillet). Evolution de la maladie, 16 jours. *Autopsie* : Congestion intense des organes.

N° 16, 513 grammes, infecté le 1er juin. Les trypan. apparaissent dans le sang en grand nombre 6 jours après l'inoculation et ils se maintiennent jusqu'à la mort de l'animal (le 25 juin). Evolution de la maladie : 24 jours. *Autopsie* : Congestion des organes; hypertrophie de la rate.

N° 17, 480 grammes, infecté le 17 août. Les parasites ont apparu 4 jours après l'inoculation. Ils sont très nombreux et le restent jusqu'à la mort, survenue le 9 septembre. Evolution de la maladie : 23 jours. *Autopsie* : Congestion intense du poumon.

N° 18, 410 grammes, infecté le 25 septembre. Les trypan. ont apparu en grand nombre 6 jours après l'inoculation. Evolution de la maladie : 39 jours. *Autopsie* : Rate hypertrophiée.

b) *Témoins avec Surra* :

N° 19, 550 grammes, infecté le 1er juin. Après 9 jours, les trypan. ont apparu dans le sang et ils se sont maintenus (quelquefois extrêmement rares) jusqu'à la mort (le 4 juillet). Evolution de la maladie : 32 jours. *Autopsie* : Congestion des viscères abdominaux.

N° 20, 560 grammes, infecté le 8 juillet; après 5 jours, il avait dans le sang des parasites nombreux, qui se sont maintenus jusqu'à la mort, le 19 août. Pendant l'évolution de la maladie, 5 jours avant la mort, il a fait une crise

après laquelle, pendant 2 jours, l'examen du sang fut négatif. Evolution de la maladie : 39 jours. *Autopsie* : Congestion des organes.

N° 21, 390 grammes, infecté le 25 juillet; 6 jours après, l'examen du sang est positif jusqu'au 7 août. A partir de cette date, les parasites deviennent très rares et plusieurs jours de suite l'examen est même complètement négatif. L'animal est mort sans avoir de trypan. dans le sang (le 22 août). Evolution de la maladie : 27 jours. *Autopsie* : Congestion du poumon et pleurésie séro-fibrineuse.

N° 22, 450 grammes, infecté le 26 juillet; après trois jours, il avait des trypan., qui se sont maintenus jusqu'à la mort, le plus souvent en très petit nombre. L'animal succomba le 10 septembre. Evolution de la maladie : 45 jours. *Autopsie* : Congestion intense des organes.

Il résulte de ces expériences que :

1° L'essence de térébenthine, injectée au moment de l'infection, par l'abcès de fixation qu'elle détermine, retarde de quelques jours l'apparition des trypan. dans le sang chez les cobayes infectés avec le trypanosome de l'Ouganda ou celui du Surra;

2° Injectée chez les cobayes en pleine infection, c'est-à-dire quand ils présentent dans le sang le maximum de trypan., elle en diminue le nombre. En général, cette diminution se présente au bout de vingt-quatre ou quarante-huit heures et elle aboutit le plus souvent à leur disparition complète; pendant quatre ou cinq jours, le sang ne présente plus de parasites. Cette disparition n'est que momentanée et on voit ensuite les trypan. réapparaître progressivement;

3° Malgré les sévères conditions d'expérimentation (surtout pour les cobayes de la deuxième série, chez lesquels le traitement était commencé après 12 ou 15 jours de maladie), il y a souvent une survie notable des animaux traités par rapport aux témoins;

4° Toute injection de térébenthine entraînant une réaction locale inflammatoire suffisamment intense, provoque inévitablement la régression ou la disparition passagère des trypanosomes.

Catégorie B.

Les cobayes de cette catégorie ont toujours été infectés par la voie péritonéale avec le trypanosome de l'Ouganda et soumis ensuite au traitement par l'*atoxyl et l'essence de térébenthine.*

Première série. — Ces cobayes ont reçu chacun *deux* injections de térébenthine et d'atoxyl.

Lot a. — Les animaux de ce lot ont toujours reçu la première injection de térébenthine en même temps que l'inoculation du trypanosome et la première injection d'atoxyl quand les parasites étaient très nombreux dans le sang.

N° 23, 400 grammes, infecté le 20 octobre et injecté le même jour avec 1 cent. cube d'essence de térébenthine. Les trypan. ont apparu dans le sang 8 jours après et deviennent très nombreux 6 jours plus tard. *Le* 7 *novembre*, on lui injecte 0,015 gr. d'atoxyl. Le 14 novembre, il reçoit de nouveau, simultanément et en quantités égales, de l'essence de térébenthine et de l'atoxyl. Il n'y a pas de réaction locale ; les trypan. pendant 4 jours sont très rares. Après cet intervalle ils se multiplient progressivement jusqu'à la mort (le 28 novembre). Évolution de la maladie : 38 jours. *Autopsie* : Congestion intense des organes ; nécrose des muscles de la cuisse gauche.

N° 24, 430 grammes, infecté et injecté avec térébenthine le 20 octobre. Les parasites ont apparu dans le sang 9 jours après et pendant 7 jours ils sont en petit nombre. Le 7 novembre, il reçoit la première injection d'atoxyl (0,015 gr.); les trypan. se maintiennent très nombreux. Le 13 novembre, il reçoit la deuxième injection de térébenthine et d'atoxyl. 48 heures après l'examen du sang est négatif. *Le* 22 *novembre*, l'animal succombe. Evolution de la maladie : 32 jours. *Autopsie* : hémorragie abdominale consécutive à la rupture du foie.

Lot b. — Ces cobayes recevaient simultanément les injections de térébenthine et d'atoxyl. Les deux premières étaient toujours faites à l'acmé de la maladie.

Voici trois observations :

N° 25, 390 grammes, infecté le 20 octobre. Après 5 jours, les trypan. apparaissent dans le sang. *Le* 7 *novembre*, ils étaient extrêmement nombreux. Le cobaye reçoit la première inoculation de térébenthine (1 cent. cube) et d'atoxyl (0,020 g.). Les trypan. ont complètement disparu, et ce n'est qu'après 6 jours que nous avons trouvé un parasite dans la préparation. *Le* 13 *novembre*, deuxième injection de térébenthine et d'atoxyl (mêmes quantités), après laquelle, pendant encore 5 jours, disparition des parasites. Après cet intervalle, ils ont réapparu, au commencement moins nombreux, au bout de 5 jours et jusqu'à la mort très nombreux. Evolution de la maladie : 37 jours. *Autopsie* : Les organes de la cavité abdominale un peu congestionnés, un abcès dans la fesse gauche.

N° 26, 390 grammes, infecté le 20 octobre ; 6 jours après, les trypan. apparaissent dans le sang et se multiplient très vite. *Le* 7 *novembre*, première injection de térébenthine et d'atoxyl (les mêmes doses). Pendant les 6 jours suivants, une seule fois nous avons eu un examen positif. *Le* 13 *novembre*, il reçoit la deuxième injection de ces deux substances (les mêmes doses); pendant 5 jours les parasites disparaissent de nouveau. A la fin ils ont réapparu et ils se sont maintenus dans le sang jusqu'à la mort (le 11 décembre). Évo-

lution de la maladie : 52 jours. *Autopsie* : Congestion intense des organes, rate hypertrophiée.

N° 27, 390 grammes, infecté le 20 octobre. Les parasites ont apparu après 6 jours ; ils deviennent vite très nombreux. *Le* 7 *novembre*, reçoit la première injection de térébenthine et d'atoxyl (mêmes doses). Les trypan., sans disparaître complètement pendant 4 jours, deviennent très rares. *Le* 13 *novembre*, deuxième injection, après laquelle pendant 7 jours l'examen du sang reste négatif. Les trypan. réapparaissent ensuite; très rares au commencement, ils augmentent de plus en plus jusqu'à la mort (le 30 novembre). Évolution de la maladie : 40 jours. *Autopsie* : Congestion et hypertrophie de la rate,

Pour cette série d'expériences, nous avons deux sortes de témoins.

1° Témoins infectés avec le trypanosome de l'Ouganda et injectés avec de l'atoxyl. La première injection a toujours été faite quand le cobaye était en pleine maladie.

Voici deux observations :

N° 28, 390 grammes, infecté le 20 octobre; 6 jours après il avait des trypan. dans le sang. Le 7 novembre, il reçoit la première injection d'atoxyl (0,020 gr.) et, le 13 novembre, la deuxième. L'examen du sang est négatif pendant 4 jours seulement après la deuxième injection; les parasites deviennent très vite nombreux et augmentent jusqu'à la mort (le 2 décembre). Évolution de la maladie : 52 jours. *Autopsie* : Rate très grosse et congestionnée.

N° 29, 310 grammes, infecté le 20 octobre; 5 jours après il avait des parasites. Le 7 novembre, il reçoit la première injection d'atoxyl (0,015 gr.), et le 13 novembre la deuxième. Les trypan. disparaissent pendant 4 jours après la première injection; ils réapparaissent, ne sont pas influencés par la deuxième injection d'atoxyl et augmentent jusqu'à la mort de l'animal (le 15 novembre). Évolution de la maladie : 25 jours. *Autopsie* : Cachexie très prononcée et hyperémie des viscères abdominaux.

2° Témoins qui ont été infectés avec le trypanosome de l'Ouganda et n'ont pas été soumis au traitement par l'atoxyl.

Voici deux observations :

N° 30, 480 grammes, infecté le 20 octobre; 7 jours après, les trypan. apparaissent dans le sang; ils deviennent vite nombreux et le restent jusqu'à la mort (le 15 décembre) de l'animal. Évolution de la maladie : 45 jours. *Autopsie* : Hypertrophie énorme de la rate.

N° 31, 450 grammes, infecté le 20 octobre; 6 jours après, les parasites apparaissent dans le sang. Ils deviennent vite extrêmement nombreux et se maintiennent toujours très nombreux jusqu'à la mort (le 13 décembre). Évolution de la maladie : 42 jours. *Autopsie* : Congestion intense du poumon.

Deuxième série. — Les cobayes de cette série ont reçu *plusieurs* injections d'essence de térébenthine et d'atoxyl.

La quantité de térébenthine injectée a été toujours de 1 cent. cube et une nouvelle injection était faite seulement quand l'abcès, produit par l'injection précédente, était ouvert.

Les injections d'atoxyl ont été faites pour un premier lot de huit en huit jours, et pour un deuxième lot de cinq jours en cinq jours, sans tenir compte si les trypanosomes existaient ou non dans le sang. La quantité d'atoxyl par cobaye était de 0,035 grammes en deux injections de 0,015 — 0,020 grammes à intervalle de vingt-quatre heures. Le traitement était commencé deux ou trois jours après l'apparition des trypanosomes dans le sang.

Lot a. — Les cobayes ont reçu, d'après la technique indiquée, les injections de térébenthine et celles d'atoxyl de huit en huit jours.

N° 32, 560 grammes, infecté le 22 février: 6 jours après les parasites apparaissent dans le sang. Le 1er mars il a reçu la première injection d'atoxyl et de térébenthine. Les injections ont été répétées régulièrement tous les 8 jours (12 injections d'atoxyl et 5 de térébenthine). Les 14 premiers jours les parasites disparaissent complètement. Ensuite ils disparaissent seulement pendant les 4 ou 5 jours qui suivent chaque injection et ils disparaissent également vers la fin de la maladie. Les trypan. étaient toujours en très petit nombre. *Le* 30 *avril*, l'animal succombe. Évolution de la maladie : 68 jours. *Autopsie* : Pleurésie, péritonite purulente, foie couvert d'une membrane fibrineuse.

N° 33, 650 grammes, infecté le 22 février. Les parasites apparaissent dans le sang 5 jours après, on commence le traitement le 1er mars. Il reçoit dans les mêmes conditions, jusqu'au 13 avril, 10 injections d'atoxyl et 5 d'essence de térébenthine. Il n'a présenté que de très rares trypanosomes dans le sang vers la fin de la maladie. On le trouve mort le 14 avril, sans présenter de parasites, mais avec deux grands abcès. Evolution de la maladie : 52 jours. *Autopsie* : Le cadavre présente un abcès à chaque fesse. Congestion intense du foie et des reins.

N° 34, 415 grammes, infecté le 22 février. Les parasites ont apparu dans le sang 5 jours après. On commence le traitement le 29 février. Pendant 70 jours, l'animal reçoit 12 injections d'atoxyl et 5 injections de térébenthine. Les trypan. disparaissent complètement 48 heures après les deux premières injections, réapparaissent seulement le 5 avril, 31 jours après. Une nouvelle injection d'atoxyl et de térébenthine provoque de nouveau la disparition jusqu'au 5 mai (21 jours). Le 6 mai, mort. Evolution de la maladie : 74 jours. *Autopsie* : Muscles de la cuisse droite complètement atrophiés; un abcès à la cuisse gauche; cadavre complètement cachectique: congestion et œdème du poumon.

Lot b. — Les cobayes reçoivent tous des injections d'atoxyl de 5 en 5 jours. On ne répète plus les injections de térébenthine avant que l'abcès soit guéri. On commençait le traitement

quand le nombre des trypanosomes dans le sang était extrêmement grand.

N° 35, 660 grammes, infecté le 15 mars; 4 jours après, présente des trypan. dans le sang. On commence le traitement le 22 mars. L'animal reçoit 4 injections d'atoxyl et une seule de térébenthine. Cette dernière injection a déterminé chez lui une grosse inflammation du pied droit. Les parasites ont disparu 24 heures après le traitement, et ils n'ont plus réapparu jusqu'à la mort (le 4 avril), qui a été provoquée par la gangrène du pied droit. Evolution de la maladie : 20 jours. *Autopsie* : Gangrène du membre postérieur droit. Du même côté, un gros abcès dans la cuisse. Congestion des organes.

N° 36, 750 grammes, infecté le 15 mars. Les trypan. apparaissent 3 jours après dans le sang. Le 23 mars, l'animal reçoit une injection de térébenthine et trois d'atoxyl. Les parasites ont disparu complètement après la première injection. Le 6 avril, l'animal est tué par suite d'un accident. Evolution de la maladie : 22 jours.

N° 37, 520 grammes, infecté le 15 mars. Les trypan. apparaissent 5 jours après dans le sang. Le 23 mars, on commence le traitement. L'animal reçoit jusqu'au 26 avril 10 injections d'atoxyl et 3 de térébenthine. Les trypan. disparaissent complètement après la première injection. La dernière injection a été faite 24 jours avant la mort. Evolution de la maladie : 67 jours. *Autopsie* : Congestion des organes de la cavité abdominale.

N° 38, 350 grammes, infecté le 18 octobre 1912. 13 jours après, les trypan. apparaissent dans le sang. On commence le traitement le 4 novembre, et jusqu'au 3 décembre, il a reçu 10 injections d'atoxyl et 4 de térébenthine. Les parasites disparus 48 heures après le commencement du traitement, ne sont plus réapparus. L'animal est mort accidentellement le 29 janvier. Evolution de la maladie, 101 jours. *Autopsie* : Hémorragie abdominale consécutive à la rupture du foie.

N° 39, 416 grammes, infecté le 18 octobre 1912. 5 jours après, les trypan. apparaissent dans le sang. Le traitement, commencé le 4 novembre, l'animal reçoit jusqu'au 1er février 1913, 10 injections d'atoxyl et 4 de térébenthine; la dernière étant faite 58 jours avant la mort. Les trypan. disparaissent complètement après la première injection, 62 jours de suite. Réapparus 17 jours après la dernière injection, ils s'y sont maintenus jusqu'à la mort. Evolution de la maladie, 104 jours. *Autopsie* : La rate hypertrophiée, le foie congestionné et plein de nodules blancs.

N° 40, 440 grammes, infecté le 18 octobre 1912. Présente 4 jours après des trypan. dans le sang. On commence le traitement le 4 novembre. L'animal reçoit 10 injections d'atoxyl et 4 de térébenthine; la dernière étant faite 67 jours avant la mort. Les trypan., disparus 2 jours après le traitement, sont réapparus 26 jours avant la mort (le 10 février). Evolution de la maladie, 113 jours. *Autopsie* : Cachexie, congestion des organes.

N° 41, 650 grammes, infecté le 2 novembre 1912. Présente 3 jours après des trypan. dans le sang. On commence le traitement le 11 novembre, l'animal recevant dans un intervalle de 21 jours, 8 injections d'atoxyl et 2 de térébenthine. Les parasites ont disparu du sang 24 heures après la première injection et ils n'y sont plus réapparus jusqu'à la mort. Le 13 décembre (4 jours avant la mort), le cobaye a fait une paraplégie. Une souris inoculée dans le péritoine avec le sang de l'animal n'a rien donné. Evolution de la maladie, 47 jours. *Autopsie* : Congestion des organes.

Nous avons fait également deux séries différentes de témoins :

1° Dans la première série, les témoins infectés avec le trypanosome d'Ouganda étaient soumis au traitement exclusif par l'atoxyl. Les injections étaient faites tous les 8 ou tous les 5 jours.

N° 42, 585 grammes, infecté le 22 février, présente des trypan. dans le sang 4 jours après. On commençait le traitement le 1er mars et avec un total de 12 injections d'atoxyl. Après les deux premières injections, les trypan. ne disparaissent que pendant 4 ou 5 jours. On trouve l'animal mort le 18 mai; évolution de 86 jours; parasites en quantité pendant 2 mois dans le sang. *Autopsie* : Rate hypertrophiée et congestionnée; œdème du poumon.

N° 43, 770 grammes, infecté le 22 février, présente 5 jours après des trypan. dans le sang. Le traitement, commencé le 29 mars (jusqu'au 26 avril), consiste en 13 injections d'atoxyl. Les trypan. ne disparaissent que vers la fin de la maladie, 4 ou 5 jours après chaque injection. L'animal succombe le 1er mai après une évolution de la maladie de 68 jours. *Autopsie* : Congestion et hypertrophie de la rate; congestion des reins.

N° 44, 560 grammes, infecté le 15 mars, présente 3 jours après des trypan. dans le sang. Le traitement, commencé le 22 mars, consistait en 8 injections d'atoxyl. Après chaque injection, les parasites devenaient un peu moins nombreux; une fois seulement ils ont disparu pendant 4 jours. L'animal succombe le 28 avril après une évolution de 44 jours. *Autopsie* : cachexie intense; congestion du foie.

N° 45, 600 grammes, infecté le 15 mars, présentait 4 jours après des trypan. dans le sang. Le traitement commencé le 22 mars, consistait en 6 injections d'atoxyl. Les parasites ne disparaissent que pendant 4 ou 5 jours après les trois dernières injections. L'animal succombe le 24 avril, après 40 jours de maladie. *Autopsie* : Congestion intense du poumon.

N° 46, 460 grammes, infecté le 18 octobre 1912. Les parasites apparaissent dans le sang 9 jours après. Le traitement, commencé le 5 novembre, l'animal reçoit jusqu'au 3 décembre 10 injections d'atoxyl. Après la première injection, les trypan. ont disparu et ils ne réapparaissent que le 7 janvier (35 jours après la dernière injection). Evolution de la maladie, 108 jours. *Autopsie* : Hypertrophie énorme de la rate. Congestion du foie et des capsules.

N° 47, 350 grammes, infecté le 18 octobre 1912. Les trypan. apparaissent dans le sang 4 jours après. Le 4 novembre, on commence le traitement. L'animal a reçu 10 doses d'atoxyl. Les parasites, disparus après la première injection, n'apparaissent plus que le 24 décembre (21 jours après la dernière injection). Le cobaye est mort le 20 janvier, ayant nombreux trypan. Evolution de la maladie 92 jours.

N° 48, 700 grammes, infecté le 2 novembre. Les parasites apparaissent dans le sang 7 jours après. Le traitement a commencé le 12 novembre, et jusqu'au 2 décembre le cobaye a reçu 8 injections d'atoxyl. Les trypan. ont disparu seulement les 10 jours qui suivaient les 4 premières injections. Réapparus, ils se sont maintenus dans le sang jusqu'à la fin, 19 décembre. Evolution de la maladie, 47 jours. *Autopsie* : Congestion des organes.

2° Témoins qui ont été infectés avec le trypanosome de l'Ouganda, sans être soumis ensuite au traitement par l'atoxyl.

N° 49, 620 grammes, infecté le 22 février; 3 jours après, il avait des trypan. dans le sang. En deux jours, ils deviennent innombrables et ils se maintiennent jusqu'à la mort (le 5 mars). Evolution de la maladie : 12 jours. *Autopsie* : Congestion intense des organes.

N° 50, 580 grammes, injecté le 22 février. Après 5 jours, les trypan. ont apparu dans le sang et ils se sont maintenus jusqu'à la mort (le 26 mars) en très grand nombre. Evolution de la maladie : 32 jours. *Autopsie* : Congestion et hypertrophie de la rate et congestion intense du foie.

N° 51, 450 grammes, infecté le 15 mars. Les trypan. ont apparu dans le sang 5 jours après, et 4 jours plus tard ils étaient innombrables ; ils se sont maintenus ainsi jusqu'à la mort, le 26 avril. Evolution de la maladie 41 jours. *Autopsie* : Congestion intense de tous les organes de la cavité abdominale.

N° 52, 255 grammes, a été infecté le 22 février. Les parasites ont apparu dans le sang après cinq jours. Pendant 20 jours, leur nombre était très variable, mais après cet intervalle ils sont devenus innombrables et ils se sont maintenus jusqu'à la mort (le 19 avril). Evolution de la maladie : 57 jours. *Autopsie* : Congestion et hypertrophie de la rate ; congestion du poumon.

Il résulte de ces expériences que :

1° Chez les cobayes infectés avec le trypanosome de l'Ouganda, la disparition de celui-ci après les injections répétées d'atoxyl n'est pas constante. Elle est généralement passagère ; cependant, dans certains cas, on n'observe aucune diminution du nombre des trypan., malgré les injections répétées d'atoxyl. On constate exceptionnellement une disparition de longue durée ;

2° Chez les cobayes infectés avec le même trypan., les injections d'atoxyl associées avec les abcès de fixation (produits par l'essence de térébenthine) font toujours disparaître et pour plusieurs jours les trypan. du sang ;

3° Quand on combine avec les abcès de fixation les injections d'atoxyl souvent répétées, on arrive presque toujours à faire disparaître complètement les trypan. pour longtemps ; parfois on constate même une survie notable de l'animal, mais on ne peut obtenir la guérison complète et définitive ;

4° Les cobayes de 400 et 600 grammes peuvent bien supporter jusqu'à 12-13 injections d'atoxyl et peut-être davantage (chaque injection étant entre 0,015 à 0,020 grammes). Quant aux abcès de fixation, il ne faut pas dépasser la dose de 1 cent. cube d'essence de térébenthine, le nombre des injections possibles se trouve limité du fait de l'amaigrissement qu'elles entraînent chez les animaux gardés longtemps en observation. C'est à cette cause que l'on peut rapporter la mort de certains animaux avant les témoins ;

5° Le traitement mixte apparaît supérieur au traitement par l'atoxyl seul. L'essence de térébenthine, par elle-même ou par l'abcès de fixation qu'elle provoque, facilite probablement la formation de trypanotoxyl, véritable substance active de l'atoxyl sur les trypanosomes dans les organismes infectés ;

6° En somme, il est évident que le traitement par l'essence de térébenthine seule, ou mieux le traitement combiné, est un obstacle momentané à la multiplication des trypan. dans le sang. Pour cette raison, on doit l'ajouter au traitement des trypanosomiases chez les animaux résistants aux arsenicaux, pour faciliter l'action de ces dernières substances sur les trypan. abrités dans les capillaires de divers organes;

7° Il nous semble que cette question mérite d'être reprise en pratique, pour traiter les grands animaux qui sont plus forts et chez lesquels on peut entretenir des abcès de fixation avec forte réaction locale sans débiliter beaucoup l'organisme.

En terminant ce travail, nous tenons à adresser nos sincères remercîments à M. le professeur Mesnil pour l'accueil cordial que nous avons reçu dans son laboratoire.

RECHERCHES DE PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE

(QUATRIÈME MÉMOIRE)

INFLUENCES RESPECTIVES DES ÉLÉMENTS DE LA SOLUTION MINÉRALE SUR LE DÉVELOPPEMENT DU MAÏS

par P. MAZÉ.

(Avec les planches I, II, III, IV.

Il résulte des conclusions des trois mémoires précédents que le maïs peut être considéré maintenant comme une plante docile à toute sollicitation expérimentale.

Il est donc possible d'entreprendre l'étude des influences qu'exerce sur son développement chacun des éléments qui entrent dans la composition de la solution minérale.

Tous les corps que j'y ai introduits ne sont pas nécessaires de prime abord : on ne voit pas bien, par exemple, le bénéfice que la plante retire, dans tous les cas, du carbonate de calcium en excès, surtout si le calcium entre déjà dans un autre composé présent dans la solution.

Il s'agit d'en démontrer l'utilité.

Je n'ai pas établi non plus que les solutions constituées par tous les éléments que j'ai employés sont capables d'assurer la fructification du maïs, lorsqu'on fait usage d'eau distillée chimiquement pure. Chaque fois que je me suis proposé d'atteindre ce but, j'ai eu recours à l'eau de source afin d'éviter les tâtonnements indéfinis qu'une solution mal équilibrée et privée d'un ou de plusieurs éléments nécessaires m'aurait forcément imposés.

L'expérience démontrera qu'une solution faite avec de l'eau distillée pure additionnée de tous les éléments que j'ai mis en œuvre ne permet pas l'évolution complète du maïs. Comme je ne connais pas encore ceux qui lui manquent, l'étude des autres éléments peut paraître prématurée.

Il n'en est rien ; on peut, en effet, négliger ce détail parce que les solutions que j'ai employées satisfont, on le sait, à la

loi des rapports physiologiques. Une solution qui ne remplirait pas cette condition serait impropre à l'étude des questions que je vais aborder.

Elle ne permet pas, en effet, d'affirmer si le retard ou l'arrêt de la végétation provoqué par la suppression d'un élément est dû à son absence, ou s'il doit être attribué à une cause d'ordre physiologique dont l'origine réside dans une modification de la solution survenue au cours de la végétation.

Toutes les tentatives faites jusqu'ici dans le but de démontrer l'utilité encore contestée de tel ou tel élément ne lèvent pas ce doute, pour la raison que je viens d'indiquer. Je n'aurai donc pas à me prononcer entre les diverses opinions qui admettent que le fluor, l'iode, l'aluminium, le bore, etc., peuvent exercer une influence heureuse sur le développement des végétaux supérieurs.

Je ne conclurai pas davantage à la nécessité d'employer l'un des éléments qui entrent dans mes solutions, si sa suppression n'aboutit pas à la mort de la plante ou à un arrêt très net de la végétation. C'est le cas du silicium. Les plantes privées de silicates, autres que ceux qui entrent dans la composition du verre des flacons de culture, m'ont fourni des retards de développement ; mais, comme mes résultats, trop peu nombreux, ne me permettent pas de donner des symptômes plus caractéristiques de la privation de silicium, je les passerai provisoirement sous silence.

Considérons donc une solution à base d'eau distillée pure, constituée par les divers éléments que j'ai employés et satisfaisant à la loi des rapports physiologiques. On pourra légitimement se prononcer sur l'utilité de l'un quelconque de ses composants, si sa suppression provoque l'arrêt de la végétation bien avant que ce symptôme ne devienne évident chez les plantes témoins qui poussent dans la solution complète. On aura aussi le droit d'affirmer qu'un ou plusieurs éléments manquent dans la solution complète, si une liqueur témoin préparée avec de l'eau de source permet à la plante de former et de mûrir ses graines, pendant que la première entraîne sa mort avant ou pendant la floraison.

Il est superflu d'ajouter que je ne me suis pas astreint à remettre à l'étude l'utilité de tous les éléments de la solution

considérés, bien entendu, individuellement. On est suffisamment fixé sur le rôle de l'azote, du phosphore, du potassium, du calcium, du magnésium, du chlore. Je ferai remarquer simplement que la suppression de l'un de ces corps n'entraîne pas la décoloration des organes aériens du maïs. La chlorophylle est moins abondante, mais elle persiste toujours dans les feuilles qui continuent de végéter péniblement, à mesure qu'elles reçoivent de celles qui se fanent des portions de plus en plus faibles de l'élément qui manque.

J'aurais pu joindre à la liste précédente le soufre et le fer, dont la privation affecte bien plus le développement du maïs que l'absence du chlore.

Mais comme c'est leur étude qui a été la plus féconde en résultats nouveaux, je l'exposerai longuement.

Cette ventilation faite, j'examinerai donc l'influence du carbonate de calcium, du soufre, du fer, du manganèse et du zinc sur le développement du maïs.

Influence du carbonate de calcium.

L'addition de carbonate de calcium à la solution nutritive est une précaution dont l'utilité n'est pas évidente. Le calcium a été employé rarement sous cet état en pareille occurrence, et l'on s'étonnera peut-être de me voir affirmer que c'est grâce à lui que j'ai pu réussir à assurer la fructification du maïs. Mais comme on a saisi toute l'importance des échanges qui se font entre la plante et la liqueur nutritive, il n'est pas excessif d'avancer une affirmation aussi catégorique.

Je n'ai pas hésité à lui attribuer la fructification du maïs alimenté avec du chlorure d'ammonium (2e mémoire) (1).

Pour donner plus de force à cette conclusion, j'ai placé une série de six plantules de maïs dans des solutions P × 1 préparées avec de l'eau distillée et pourvues de chlorure d'ammonium comme aliment azoté. Un lot se développait en présence de carbonate de calcium; l'autre en était privé; mais on avait pris la précaution d'offrir à ce dernier le calcium à l'état de chlorure, à raison de 0,2 p. 1.000.

(1) Ces *Annales*, août 1913, p. 663, t. XXVII.

Le résultat est inscrit dans la figure 1 :

Il est très probant, comme on peut le constater, et je consi-

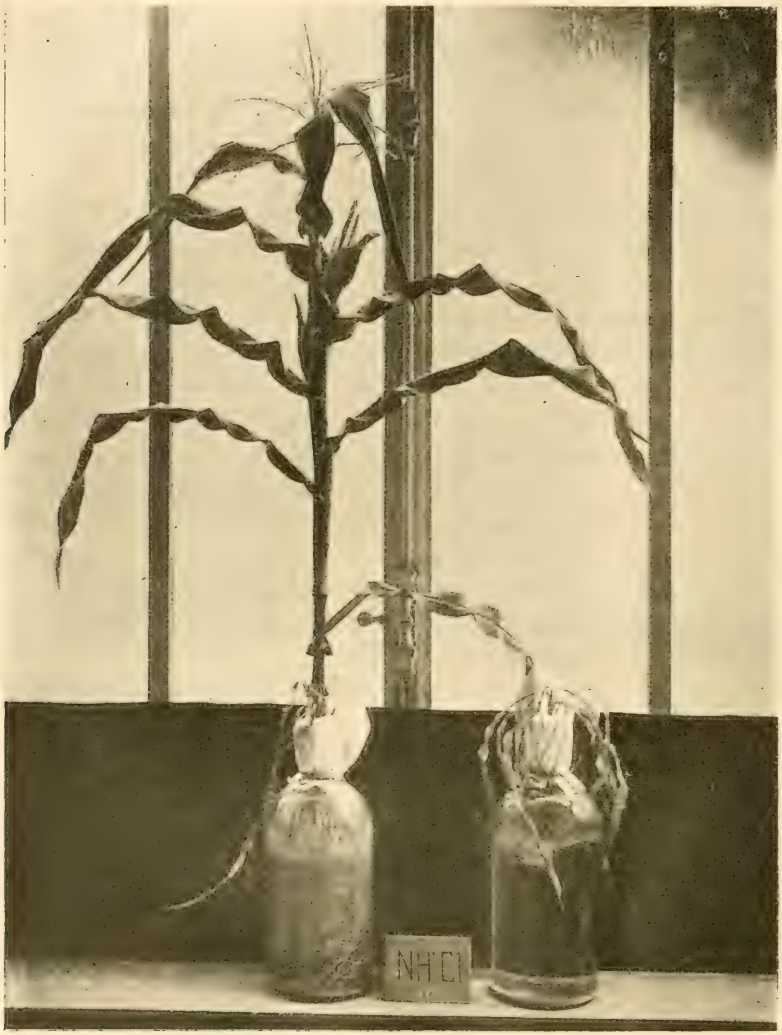


Fig. 1.

dère qu'il est tout à fait superflu de le traduire par des chiffres dont l'écart peut atteindre facilement 50 grammes.

Les plantes qui ont végété dans la solution privée de carbo-

nate se sont développées comme les témoins pendant quelques jours; on peut vérifier sur la photographie que les premières racines sont longues et ramifiées; mais elles ne sont pas nombreuses; celles qui se sont formées par la suite cessent de s'allonger dès qu'elles atteignent le liquide; leur nombre s'est accru jusqu'à la mort de la plante, survenue quatre ou cinq jours avant la date de la photographie.

Elles forment une sorte de cône dont la pointe est placée au niveau du goulot et dont la base est constituée par la surface libre du liquide.

Ces particularités laissent entendre que la solution s'est modifiée profondément au cours de la végétation; mais on conçoit difficilement que l'acidification, presque négligeable en raison de la faible quantité de chlorure d'ammonium mis en œuvre dans 4 litres et demi de solution nutritive, constitue la cause unique d'un effet aussi considérable (1).

Il est vraisemblable qu'elle n'a été qu'un facteur prédisposant vis-à-vis d'une autre influence que nous allons découvrir dans la solubilisation des éléments rares ou catalytiques si l'on préfère.

Si, en effet, e carbonate de calcium agit uniquement comme régulateur de l'acidification, on doit noter une différence d'action faible ou inappréciable entre les solutions pourvues ou privées de carbonate de calcium lorsque l'aliment azoté est le nitrate d'ammonium.

J'ai montré, en effet, que le nitrate d'ammonium, assimilable sans résidu, influe peu sur la réaction de la solution nutritive; mais elle s'acidifie cependant pour les raisons que j'ai indiquées (2).

La figure 2 montre que les maïs privés de carbonate accusent un retard considérable sur les plantes témoins.

Leurs racines traduisent l'action nocive de la solution; elles n'atteignent pas le fond des flacons; leur aspect est très différent de celui que présentent les racines des plantes témoins.

Les organes aériens dénotent aussi des symptômes d'intoxication: les feuilles sont striées de bandes longitudinales de

(1) Quand l'aliment azoté est le sulfate d'ammonium, les résultats sont de même ordre.

(2) Ces *Annales*, n° 8, 1913, page 661, t. XXV

parenchyme parcheminé, privé de chlorophylle; les cellules qui les constituent se gélifient dans le bourgeon même, et les feuilles restent enroulées, au lieu de s'épanouir, fortement attachées par cette gelée qui fait office de colle.

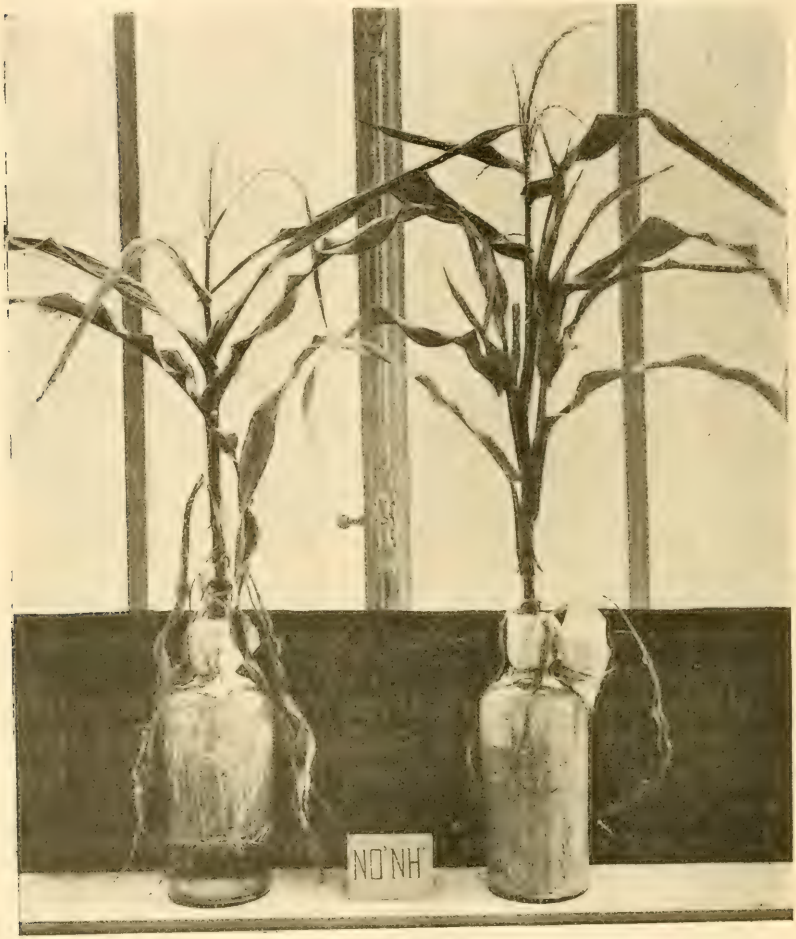


Fig. 2.

Les résultats sont de tout point semblables aux précédents lorsqu'on fait usage de nitrate de sodium comme aliment azoté; cependant les racines s'allongent davantage.

Cette fois c'est l'alcalinité qu'il faut incriminer; mais pas

plus que dans les deux séries précédentes son influence ne suffit seule à expliquer les effets observés; le carbonate de calcium n'atténue pas l'alcalinité de la solution nutritive pourvue de nitrate de sodium; malgré cela, les racines présentent un aspect normal dans les liqueurs ainsi alcalinisées jusqu'au moment où survient l'arrêt de la végétation qui n'est jamais

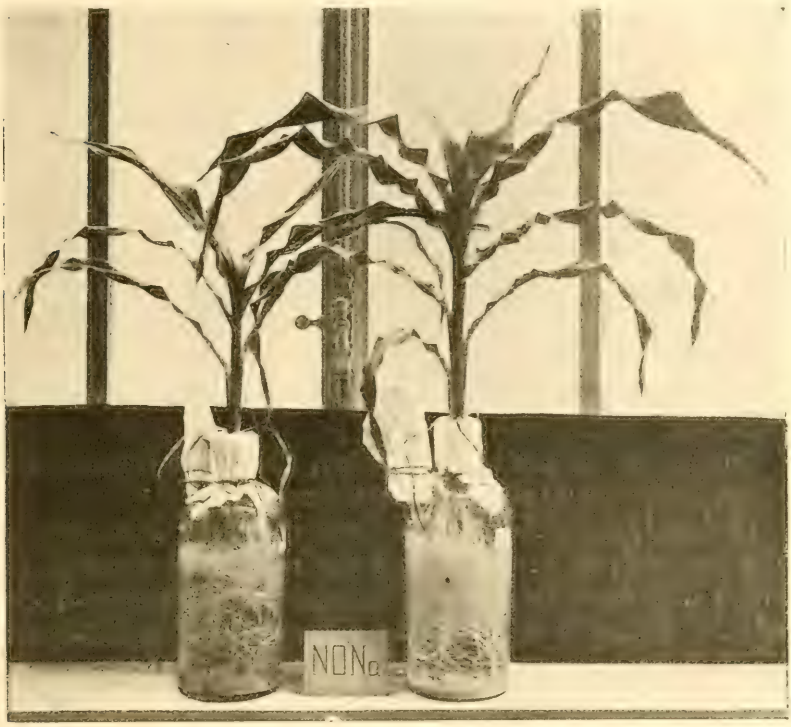


Fig. 3.

définitif avant la floraison, dans les solutions de concentration P × 1.

Il faut donc recourir ici encore à une influence due à une modification de composition de la solution. Les éléments rares insolubilisés en grande partie à l'état de phosphates se dissolvent à la faveur de l'alcalinité; l'oxyde de zinc en particulier est très soluble en présence de carbonate de sodium et de très petites quantités d'acides organiques.

Nous voici donc amenés par les faits à vérifier la tolérance du maïs pour les composés minéraux solubles du fer, du manganèse et du zinc.

Cette vérification a été faite de la façon suivante : Les plantules développées à l'abri des microbes dans l'eau distillée sont transvasées dans des flacons de 2 litres de capacité, renfermant des solutions de nitrate de fer, de nitrate de manganèse, de nitrate de zinc à des concentrations variant de 1/10.000 à 1/200.000, stérilisées préalablement.

Ces solutions ont été préparées avec de l'eau distillée pure : j'ai donné la préférence aux nitrates parce que l'acide nitrique est mieux utilisé que les autres acides minéraux.

Les résultats montrent que l'action nocive exercée par le nitrate de zinc et le nitrate de manganèse se traduit encore par l'aspect des racines jusqu'à la concentration de 1/160.000; elle reste perceptible pour le fer jusqu'à la dose de 1/100.000; mais ces conditions de dilution extrême ne nuisent pas à la longévité des plantules, qui n'offrent du côté des organes aériens que très peu de différences avec les plantes qui végètent dans l'eau distillée pure.

En deçà de ces limites de dilution, l'influence nuisible des éléments considérés augmente rapidement.

La dose 1/40.000 de nitrate de manganèse ou de nitrate de zinc empêche le développement des racines, et entraîne en moins d'un mois la mort des plantules; la richesse de la solution en zinc et en manganèse est cependant bien inférieure à celle des solutions complètes de concentration P $\times$ 1, où leur présence est indispensable.

Avec le nitrate de fer, la dose paralysante atteint 1/10.000 et, chose assez curieuse, ses effets ne sont pas plus sensibles à 1/5.000 et à 1/4.000; cette particularité s'explique par ce fait que les racines, qui ne se développent pas, peuvent cependant s'adapter et s'opposer à l'absorption du fer.

Ces faits démontrent que le fer, le manganèse et le zinc sont très toxiques pour le maïs, à la concentration que j'ai adaptée pour les milieux complets, lorsqu'ils sont maintenus en solution.

Si leur influence nuisible ne s'est pas fait sentir sur le développement de la plante, c'est parce que le carbonate de cal-

cium les insolubilise. On s'explique ainsi que la suppression du carbonate de calcium, qui rend leur solubilisation possible par l'acidification et même par l'alcalinisation progressives de la liqueur, entraîne l'arrêt de la végétation et gêne dès les premiers jours le développement des racines.

Le carbonate de calcium exerce donc une influence doublement utile sur le développement du maïs dans les milieux minéraux:

Il atténue l'acidité des solutions de sulfate et de chlorure d'ammonium; il précipite les éléments terreux et les rend inoffensifs; mais comme ils sont indispensables, la plante les absorbe, bien qu'ils soient insolubles, avec le concours des excrétions de ses racines; elle peut ainsi régler exactement leur absorption sur la consommation qu'elle en fait, et éviter d'introduire dans la sève des éléments qui deviennent toxiques dès qu'ils s'y accumulent.

Le rôle du carbonate de calcium méritait, comme on le voit, d'être examiné de près; il est évident qu'il ne se comporte pas autrement dans la terre. J'en avais le pressentiment déjà en 1897, lorsque je l'ai introduit pour la première fois dans les solutions dont je me servais; on peut d'ailleurs constater que mes solutions n'ont pas varié depuis, dans leur nature (1). Mais à cette époque, le carbonate de calcium devait y remplir une des conditions que les sols fertiles réalisent invariablement. L'expérience prouve que la mesure était fortement justifiée.

L'introduction du fer, du manganèse et du zinc dans ces solutions, conformément aux indications tirées de la composition des cendres végétales, et du mémorable travail de Raulin sur l'*Aspergillus niger*, n'était pas moins heureux, comme on va le voir.

Il convient en effet de justifier leur emploi; si je ne l'ai pas discuté jusqu'ici, c'est parce que je n'avais pas à ma disposition le critérium indispensable : la connaissance précise des conditions de la fructification.

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XIV, p. 30, 1900.

Influence du soufre et du fer sur le développement du maïs.

Le soufre et le fer figurent parmi les éléments nécessaires aux végétaux supérieurs. Il s'agit donc moins d'insister sur leur utilité que d'examiner leur rôle avec les moyens que nous pouvons mettre en œuvre.

Leur influence sur la couleur verte des végétaux supérieurs a été également mise en évidence, celle du soufre dans le sulfatage des légumineuses, qui prennent une couleur plus foncée après le traitement; celle du fer dans la production de la chlorophylle.

Mais ni l'un ni l'autre élément n'entre dans la composition de la matière verte des végétaux; l'étude de leur rôle dans la végétation ne perd pas pour cela de son intérêt, bien au contraire.

J'ai donc préparé des solutions minérales privées de soufre ou de fer avec de l'eau distillée pure. Pour supprimer le soufre, j'ai remplacé le sulfate de magnésium par du chlorure et le sulfate ferreux par du nitrate ; le fer a été éliminé par la suppression du sulfate ferreux.

Les cultures, poursuivies pendant trois années consécutives à partir de 1910, ont porté sur plusieurs milieux différant par la nature de l'aliment azoté; j'ai employé parallèlement ou successivement les nitrates de sodium, d'ammonium et de calcium. La concentration des solutions a toujours été $P \times \frac{1}{2}$; cette précaution avait pour but de réduire autant que possible les impuretés chimiques que les divers sels employés introduisent dans la solution. Les cultures ont été faites dans des flacons de 2 litres de capacité (1).

Les plantes privées de soufre ou de fer évoluent exactement de la même manière. L'apparition de la chlorose est quelquefois plus précoce, quelquefois plus tardive chez les maïs privés de soufre que chez ceux qui sont privés de fer; mais l'écart ne dépasse jamais plus de trois ou quatre jours. C'est

1) Les plantes qui sont représentées dans les figures 4, 5, 6, 7 et 8 ont végété dans des solutions $P \times \frac{1}{2} NO^3NH^4$.

pour cette raison que je ne me suis pas astreint à exposer les deux séries d'expériences dans deux chapitres séparés ; j'y trouve l'avantage d'éviter les répétitions.

L'évolution des plantes soumises à l'expérience ne diffère pas, pendant quelques jours, de celle des maïs placés dans des solutions complètes.

La figure 4, qui reproduit une série de plantes âgées de 20 jours, vient à l'appui de cette assertion.

Quelques jours plus tard, les conditions changent ; la chlorose apparaît brusquement chez les plantes privées de soufre ou de fer (fig. 5), elle se manifeste par la décoloration gra-

Fig. 4.

De gauche à droite :

2 plantes privées de Zn.	2 plantes privées de Cl.
2 plantes témoins.	2 plantes privées de S.
2 plantes privées de Mn.	1 plante privée de Fe.

duelle de la première feuille atteinte, qui est presque toujours la quatrième formée après le transvasement des plantules. Les suivantes sont entièrement décolorées, y compris les cellules qui avoisinent les faisceaux vasculaires, lesquelles conservent généralement leur teinte verte dans la chlorose naturelle, et font ressortir ainsi d'une façon très nette les parcours sinueux des nervures les plus fines. (V. Pl. III).

A partir de ce moment, la végétation se ralentit, les premières feuilles chlorotiques atteignent cependant une taille peu différente de celles qui les précèdent. Les suivantes sont de plus en plus réduites.

Cet aspect persiste pendant plusieurs semaines ; puis les

feuilles inférieures vertes se dessèchent. La tige reprend alors sa croissance et la chlorophylle apparaît sur les dernières feuilles très réduites qui se forment pendant cette deuxième phase du développement. Le fer ou le soufre libérés par la mort des feuilles vertes a provoqué vraisemblablement cette reprise d'activité qui aboutit à la formation d'une plante naine où l'épis femelle fait toujours défaut, et l'épi mâle est réduit à un pinceau minuscule d'axes avortés et privés de toute formation

Fig. 5.

De gauche à droite :

1 plante privée de Zn.
1 plante témoin.
1 plante privée de Mn.
1 plante privée de Cl.
1 plante privée de S, chlorotique.
1 plante privée de Fe, chlorotique.

florale. Le poids moyen des plantes varie de 4 à 6 grammes.

Le parenchyme des cellules décolorées est transparent sur beaucoup de points; on constate, à l'œil nu, que ces cellules sont dépourvues de toute trace de réserve et presque de matières protoplasmiques ; elles diffèrent en cela des cellules décolorées du maïs panaché qui forment un tissu opaque et dense.

Pour faire apparaître la chlorophylle, il suffit de déposer sur les feuilles des gouttelettes de sulfate d'ammonium ou d'azotate de fer en solution à 2 ou 4 décigrammes par litre. Au bout de 3 jours après le traitement, les cellules qui ont reçu les traces

de sulfate ou de nitrate de fer abandonnés par l'évaporation des gouttelettes, tranchent nettement par leur couleur verte sur le parenchyme environnant. La couleur s'accentue avec le temps, et les cellules, ainsi alimentées directement en soufre ou en fer, reprennent leur activité fonctionnelle.

Maintenant que nous savons que la transpiration constitue un moyen de contrôle et de mesure de cette activité, il nous

Fig. 6.

De gauche à droite :

2 plantes privées de Zn.
2 plantes privées de Mn.
2 plantes privées de Zn + Mn.
Voir pour le témoin la fig. 5.

est facile de démontrer cette dernière proposition par l'expérience aussi bien que par la recherche de l'amidon dans les corps chlorophylliens.

Si, en effet, on coupe les feuilles qui présentent des taches vertes bien formées, et qu'on les place entre deux plaques de verre pour les exposer au soleil, la vapeur d'eau exhalée par les cellules vertes forme une buée sur les parties correspondantes du verre, au bout de quelques minutes. Les gouttelettes grossissent vite et se résolvent en gouttes d'eau, faciles à observer. Partout ailleurs, le verre reste sec.

Tous les sulfates, ou les sels de fer solubles employés en

solution très étendue produisent le même résultat que le sulfate d'ammonium ou le nitrate de fer.

En traitant les feuilles chlorotiques par tout autre composé minéral alimentaire que l'élément qui fait défaut à la plante, on n'observe pas de formation de matière verte; par contre, si on veut vérifier la présence d'un composé soluble du fer ou du soufre dans un liquide, il suffit d'en déposer quelques gouttes

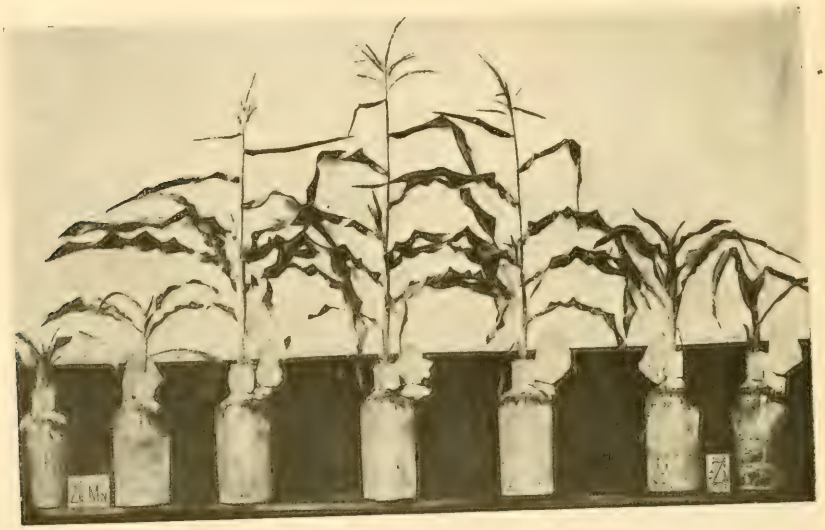


Fig. 7.

De gauche à droite :

2 plantes privées de manganèse et de zinc.	3 plantes privées de Mn. 2 plantes privées de Zn.

sur les feuilles chlorotiques; la plante indique leur présence en formant de la chlorophylle au bout de 3 jours d'insolation.

On sait que les mouches déposent de préférence leurs excréments sur les objets blancs, la nuit tout au moins. Les feuilles chlorotiques se signalent donc à leur attention. Celles qui sont entrées, par hasard, dans la véranda, n'ont pas manqué d'obéir à cette impulsion instinctive. Les petites taches brunes caractéristiques se sont auréolées avec le temps d'une couronne verte très visible.

L'hémoglobine est inactive; les feuilles ne l'absorbent pas.

Les taches de chlorophylle (voir planche IV) obtenues par

le moyen que j'ai indiqué s'étendent peu au delà du cercle formé par le dépôt abandonné par les gouttelettes de solution; le fait est très net avec les sels de fer; mais la démarcation est moins tranchée avec les sulfates; il semble que les cellules végétales retiennent moins bien ces derniers sels; il en résulte que les bords des taches vertes se dégradent et s'estompent en empiétant sur le parenchyme avoisinant.

Fig. 8.

De gauche à droite :

3 plantes témoins $P \times \frac{1}{2} NO^3NH^4$.

3 plantes même solution, privées de manganèse.

Le soufre et le fer nécessaires aux fonctions générales de la cellule vivante touchent donc de près au mécanisme intime de la fonction spéciale aux végétaux supérieurs puisque, en leur absence, la chlorophylle disparaît entièrement.

S'ils n'entrent pas dans la constitution de la matière verte, ils font vraisemblablement partie des corps chlorophylliens, et c'est surtout cette conclusion qui se dégage des faits que je viens d'exposer.

On doit considérer en effet les chloroleucites comme des

formations protoplasmiques qui se nourrissent des substances qu'elles trouvent dans le suc cellulaire; ils mènent, en quelque sorte, une existence symbiotique; leur activité fonctionnelle dépend donc en premier lieu de l'état physiologique de la cellule; à ce titre, tout élément nécessaire à cette dernière influe nécessairement sur la fonction spéciale des chloroleucites; sa suppression entraîne donc une diminution de leur activité et par conséquent une décoloration sensible de la feuille.

Mais le travail d'assimilation carbonique est lié aussi à la présence, dans les corps chlorophylliens, d'éléments nécessaires à sa réalisation; c'est parmi ces derniers que figurent le soufre et le fer.

Influence du manganèse sur le développement du maïs.

M. G. Bertrand a montré que le manganèse est indispensable au développement de l'*Aspergillus niger*; il admet avec un grand nombre d'autres expérimentateurs qu'il est nécessaire également aux végétaux supérieurs.

J'ai cherché de mon côté à vérifier l'emploi que j'en ai fait dans mes liqueurs nutritives.

Mes premiers essais datent de 1910; ils ne m'ont pas donné de résultats; ceux de 1911 ne sont guère plus probants; les figures 4, 5, 6, 7 et 8 donnent une idée du développement du maïs dans la solution P 1/2 NO^3NH^4 privée de manganèse. Les deux premiers maïs de la planche XVI, 3e mémoire, appartiennent à cette série. Leurs épis ont avorté comme ceux des témoins constitués par la série P 1/2 NO^3NH^4 du tableau II, 3e mémoire, décembre 1913, t. XXVII.

Tableau I.

	Nos d'ordre.	Age en jours.	Poids sec des plantes en grammes.	Poids de l'eau évaporée par kilogr. de poids sec, en kilogr
	—	—	—	—
Témoins.	1	101	68,83	192,5
	2	101	46,08	211,8
	3	56	19,08	188,9
Sans manganèse.	4	101	42,3	224,4
	5	101	34,56	237,5
	6	56	17,78	216,7

Le tableau I donne d'ailleurs les résultats comparatifs des poids des témoins et des plantes privées de manganèse ainsi que les volumes d'eau évaporée par les unes et les autres.

La différence de poids est sensible, comme on le voit; elle suffit jusqu'à un certain point à justifier l'utilité du manganèse : mais ce n'est pas, à mon avis, un résultat satisfaisant; tous les autres éléments envisagés jusqu'ici en ont fourni de plus probants et surtout de plus démonstratifs au point de vue de la spécialisation de leurs fonctions; et l'on peut de même constater sur les photographies 4, 6 et 7 que la privation de zinc que je vais examiner plus loin a des conséquences autrement frappantes.

Mais en 1912 j'ai réussi à obtenir les résultats cherchés.

Ceux des deux années précédentes ont laissé à désirer pour deux raisons.

La première tient en partie sans doute au verre des flacons qui cédait une dose sensible de ce métal à la solution, surtout pendant la stérilisation.

La seconde réside vraisemblablement dans le défaut de pureté des substances minérales utilisées et peut-être aussi de l'eau ; je n'avais en effet ni les moyens ni le temps de préparer des quantités aussi considérables d'eau et de sels minéraux purs.

D'un autre côté, l'emploi d'un vernis insoluble, destiné à isoler les parois des flacons, ne présente pas non plus toutes les garanties désirables, car les racines réussissent toujours à trouver les points faibles de l'enduit isolant, et s'il se trouve un endroit où son adhérence n'est pas assez forte, elles passent entre le verre et la membrane de paraffine ou de caoutchouc.

Les réserves d'éléments rares apportées par la graine ne sont pas négligeables non plus ; il est donc vraisemblable qu'on pourrait réussir à obtenir, par la suppression du manganèse, des résultats comparables à ceux que m'a donnés la privation de soufre et de fer, si l'on ne considère que le poids sec des plantes.

Cette induction est parfaitement justifiée par la loi des rapports physiologiques étendue à l'eau de végétation. Tous les éléments terreux étant insolubles en présence de carbonate de calcium, la plante les prend suivant ses besoins, dans les conditions normales d'un sol fertile. Théoriquement, il n'y a donc

pas de raison pour que la suppression d'un élément quelconque, indispensable à la plante, ne provoque pas l'arrêt de la végétation au même point de son développement, comme le soufre et le fer.

Mais, pratiquement, ce résultat ne peut être atteint qu'autant que l'élément supprimé est abondant dans la graine. La petite quantité de cet élément qui figure dans la solution comme impureté apportée par les sels minéraux, l'eau ou le verre, est alors négligeable par rapport à celle qui est tenue en réserve dans la semence; on peut négliger par exemple l'azote, le phosphore, le potassium, le magnésium, etc..., qui figurent comme impuretés dans une solution nutritive où on a supprimé l'un de ces éléments, si on met cette impureté en regard de la réserve disponible dans la graine.

Mais s'il s'agit d'un corps tel que le fer, le manganèse ou le zinc, l'impureté compte vis-à-vis de la réserve; il faudra donc prendre beaucoup de précautions pour atteindre le point théorique de l'arrêt de la végétation par la suppression des éléments rares ou catalytiques.

Les résultats que j'ai obtenus en 1912 approchent cette limite; mais les plantes atteignent encore un poids sec moyen voisin de 12 grammes. C'est un chiffre élevé, comme on le voit, et la disette de manganèse se fait sentir bien plus tard, relativement, que le manque de fer ou de soufre.

Les expériences de 1912 ont été faites avec les flacons qui avaient servi dans les mêmes conditions les années précédentes. Les décapages successifs qu'ils avaient subis par la stérilisation à l'autoclave, leur avaient fait perdre une grande partie des éléments qu'ils pouvaient céder aux solutions.

J'avais fait faire en outre quelques flacons en verre de Bohême de 4-5 litres de capacité, qui, après un décapage par l'eau acidulée portée une heure à 120 degrés, m'ont donné des résultats aussi probants que les anciens flacons.

La solution qui a servi pour ces expériences est la solution P 1/2 NO^3NH^4.

Les plantes ont présenté dès les premières semaines un retard marqué sur les témoins, qui n'étaient autres, en 1912, que les plantes dont j'ai donné l'histoire dans le troisième mémoire, tableau III.

L'aspect des feuilles devient caractéristique au bout de quinze jours ; elles sont étroites, longues, peu turgescentes et tombantes. Les deux bords du limbe sont régulièrement ondulés.

La couleur verte, moins foncée que chez les plantes témoins, s'atténue à mesure que le nombre de feuilles augmente.

L'épuisement complet du manganèse peut être considéré comme certain quand la sudation nocturne cesse.

A partir de ce moment, les feuilles diminuent de surface et de longueur ; la végétation devient languissante ; c'est le même ralentissement que celui qui a été observé chez les plantes privées de soufre et de fer. On observe également une reprise de l'activité végétative à la suite du dépérissement des feuilles inférieures et pour les mêmes raisons que celles que j'ai données à la page 31.

La plante parvenue au terme de la végétation présente un port qui rappelle une petite tige de bambou, surtout par la forme des feuilles supérieures. Pas de fleurs mâles fécondes, mais une petite ébauche d'épi femelle à l'aisselle d'une feuille.

A aucun moment, les feuilles n'ont été privées de chlorophylle.

Malgré cela, la plante est atteinte d'une chlorose visible dont l'étude m'a révélé des faits aussi intéressants qu'imprévus.

Si l'on dépose sur les feuilles formées après la disparition de la sudation nocturne une goutte de liquide exhalé par les feuilles de maïs qui végètent dans une solution complète, il se forme à l'emplacement de la goutte, au bout de vingt-quatre heures d'insolation, une tache verte due à la production de chlorophylle.

La tache prend une teinte très foncée au bout de quelques jours, et gagne de proche en proche les cellules voisines. L'empiétement se fait surtout dans le sens de la sève ascendante, c'est-à-dire vers l'extrémité de la feuille. Les taches s'étalent en coup de pinceau en suivant les faisceaux vasculaires.

Elles durent aussi longtemps que les feuilles elles-mêmes, et grandissent jusqu'à leur dépérissement. Celles qui sont représentées dans la planche IV, sur les deux feuilles de droite, ont été obtenues par le moyen que je viens d'indiquer.

Mais, contrairement à ce qui se passe pour les chloroses sulfurique et ferrique, les sels solubles de manganèse sont sans

action sur les feuilles rendues chlorotiques par privation de manganèse.

L'exsudat de maïs exerce sur la chlorose manganique une action spécifique; l'exsudat de chou, de millet, de pavot ne produit rien de semblable, bien qu'il contienne vraisemblablement du manganèse.

Si l'on décolore des feuilles de maïs normal par un mélange à volume égal d'éther et d'alcool, qu'on dessèche, qu'on réduise en poudre les feuilles traitées, et qu'on en fasse une macération à froid dans l'eau distillée pendant deux ou trois heures, le liquide ainsi obtenu agit exactement comme l'exsudat. Les macérations préparées de la même manière avec des feuilles d'autres espèces végétales sont inactives.

Le maïs renferme donc une substance spécifique capable de guérir la chlorose manganique; cette substance résiste à un chauffage de quelques minutes à 100 degrés; elle est soluble dans l'alcool et insoluble dans l'éther; elle est de nature organique, car les cendres de l'extrait d'exsudat ou de macération de feuilles sont inactives, de même que la solution minérale complète qui convient le mieux au développement du maïs.

L'allure envahissante des taches vertes formées par l'exsudat s'explique dès lors très facilement. Les cellules malades, guéries par cette méthode imprévue « d'opothérapie », reprennent toute leur activité et deviennent capables de produire la substance spécifique; comme sa formation dépasse les besoins de la cellule normale, elle se diffuse dans la sève, qui la porte aux cellules voisines en empruntant de préférence la voie vasculaire. La propagation des taches dans le sens de la circulation de la sève ascendante est donc tout à fait logique.

Les cellules guéries reprennent toute leur activité fonctionnelle; on peut le constater par l'intensité de la transpiration.

Plus que la réduction du poids des plantes privées de manganèse, cette réaction physiologique met en évidence l'utilité du manganèse pour les végétaux supérieurs; elle démontre pour la première fois la formation chez les végétaux de composés organiques doués de propriétés physiologiques spéciales. On peut les rapprocher des substances spécifiques sécrétées par les glandes ou les tissus animaux en vue des fonctions permanentes ou intermittentes, tels les composés élaborés par les

capsules surrénales, le thymus, le corps pituitaire, le placenta, etc.

Il est vraisemblable que ces substances spécifiques interviennent dans bon nombre de phénomènes physiologiques, et je ne serais pas surpris de constater que les affinités des espèces relèvent de leur présence, que les rapports du greffon avec le sujet en dépendent.

Les exsudats de maïs panaché qui ont été filtrés par les tissus décolorés sont actifs au même titre que les exsudats de feuilles normales; les cellules privées de corps chlorophylliens ne fixent pas la substance en question.

Son influence s'exerce donc sur l'assimilation carbonique, et en cela elle collabore avec le soufre et le fer à la fonction assimilatrice des corps chlorophylliens.

Il est possible qu'elle renferme du manganèse; mais il est plus vraisemblable que ce dernier, nécessaire à la cellule considérée dans ses fonctions générales, favorise, comme tous les éléments qui lui sont indispensables, l'élaboration de la substance visée, puisque le manganèse minéral est sans influence sur les corps chlorophylliens.

Influence du zinc sur le développement du maïs.

Le rôle du zinc chez les végétaux supérieurs a été étudié par M. Javillier; il a déduit de ses expériences que ce corps doit figurer au nombre des éléments indispensables aux plantes vertes (1).

J'ai examiné son action sur le maïs parallèlement à celle du manganèse, en utilisant la solution $P \times 1/2\ NO^3NH^4$; les résultats que j'ai obtenus sont devenus plus probants d'année en année, comme ceux qui découlent de l'étude du manganèse, mais plus vite que ces derniers, comme le prouve la photographie (fig. 5) qui est du 3 juin 1911.

Les résultats de 1910 ne sont pas concluants. J'ai noté simplement la formation d'un dépôt léger, de couleur rouille, sur les racines. Le même symptôme s'est manifesté en 1911, avec une intensité moindre; il a fait défaut en 1912, où j'ai réussi à

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXII, p. 720.

obtenir des résultats voisins de ceux que la théorie permet de prévoir. Les cendres des racines qui portent un dépôt ocreux renferment des sulfures. La présence de sulfure dans les cendres est corrélative de la privation de zinc; c'est un résultat que je n'ai pas observé dans d'autres circonstances (1). Mais ce caractère disparaît lorsque la privation de zinc est à peu près complète. Dans ces conditions, la plante meurt en quelques jours, après l'apparition des premiers troubles de végétation. Lorsque la dose de zinc, insuffisante, mais relativement élevée, permet à la plante de se développer, elle se défend; et la formation de corps sulfurés en abondance apparaît comme une phase d'une intoxication lente : quand celle-ci est brutale, les corps sulfurés manquent.

L'aspect de la végétation change suivant l'importance de la dose de zinc qui reste comme impureté dans les solutions nutritives. Les résultats de 1910 ne présentent rien de particulier du côté des organes aériens. Ceux de 1911 (fig. 4, 5, 6 et 7) montrent que la tige principale meurt assez vite; quelques bourgeons axillaires partent de la base des feuilles inférieures, donnent naissance à des tiges secondaires qui périssent avant d'avoir atteint le développement de l'axe principal. Les plantes de la figure 4 présentent ces caractères; elles étaient mortes au moment où on les a photographiées.

Les résultats de 1912 sont plus caractéristiques. La végétation débute normalement; les plantes ne présentent aucune différence avec les témoins. Puis, brusquement, la couleur des feuilles se fonce et prend un reflet métallique; la sudation nocturne devient très abondante; elle laisse un dépôt visiblement anormal. On trouve dans ce dépôt tous les sels solubles de la solution nutritive.

Ce symptôme précède la mort de la plante de trois à cinq jours; il est évident qu'elle a été tuée par intoxication; autant qu'on peut interpréter son mécanisme, il est possible d'avancer que l'intoxication débute par la région des poils absorbants; on constate en effet que la plante ne peut plus régler l'absorption des éléments de la solution; les organes aériens deviennent de

(1) Les mêmes caractères s'observent lorsqu'on supprime en même temps le manganèse et le zinc (photographies 4, 5 et 6). On peut même constater que la suppression de ces deux corps précipite la mort des plantes.

simples agents d'évaporation et périssent par incrustation. Les feuilles se dessèchent par places, et en deux ou trois jours la plante entière se fane.

Trois séries successives de plantes mises en expérience en 1912 ont présenté ces caractères avec une concordance parfaite. La première série, commencée le 16 avril, prenait fin avec la mort des plantes, le 25 mai; la seconde a duré du 13 mai au 26 juin; la troisième, du 14 juin au 20 juillet.

J'ai réuni dans le tableau II quelques renseignements relatifs aux plantes de la seconde série.

Tableau II.

Numéros d'ordre		1	2	3	4
Poids sec des plantes en grammes.		3,600	3,272	5,797	5,610 (1
Cendres p. 100	Feuilles	20,15	17 »	19,45	15,50
	Tiges	12,55	11,95	12,04	10,75
	Racines	16,85	14,08	16,92	17,74
Alcalinité des cendres en NaOH p. 100.	Feuilles	5,57	6,06	3,87	5,61
	Tiges	14,24	12,97	9,31	12,89
	Racines	8,81	10,34	7,21	8,58

On voit que la richesse des feuilles en matières minérales atteint un chiffre anormal. On ne peut pas l'attribuer au phénomène d'autophagie ordinaire, qui augmente la proportion relative des cendres dans les feuilles dont la mort est due à l'âge ou à une alimentation insuffisante. (V. 2e mémoire, p. 659.)

Les feuilles des plantes privées de zinc se sont incrustées par évaporation, puisque les tiges qui ne sont pas soumises à une transpiration aussi active conservent une teneur normale en matières minérales.

L'alcalinité des cendres ne correspond pas non plus à celle que l'on observe chez les organes aériens des plantes qui se sont développées dans les solutions complètes pourvues de zinc.

L'eau d'exsudation éliminée en abondance, à l'obscurité, déposée sur les feuilles de plantes normales, est sans action sur la couleur du parenchyme. L'exsudat des feuilles normales n'exerce non plus aucun effet sur les feuilles des maïs privés de zinc.

(1) Les nos 1 et 2 ont végété dans des flacons en verre vert ayant déjà servi plusieurs fois pour des cultures en solution privée de zinc; les nos 3 et 4 étaient placés dans des flacons neufs en verre de Bohème.

Le rôle du zinc revêt donc un caractère spécial; aliment de la cellule, il semble que son action physiologique soit liée aux migrations du soufre.

C'est un côté particulier du rôle des éléments rares dont l'explication n'échappera pas, je pense, à la méthode de recherches que j'utilise :

Existe-t-il d'autres éléments minéraux nécessaires au développement du maïs?

J'ai annoncé au début de ce mémoire que la solution nutritive utilisée n'est pas suffisante pour assurer le développement complet du maïs, lorsqu'on fait usage de produits purs et d'eau distillée chimiquement pure.

Les plantes cultivées dans la solution P $\times$ 1 NO^3NH^4, préparée dans ces conditions, se développent jusqu'à la floraison comme celles qui sont alimentées par la même solution faite avec de l'eau de source; mais leur évolution s'arrête assez brusquement dès que l'épi mâle commence à se dégager de la gaine de la dernière feuille. Le phénomène de la transpiration diurne, jusque-là très actif, s'arrête aussi. La plante reste stationnaire pendant quelques jours sans modification apparente, puis les feuilles se dessèchent par places et la plante périt. La plante la plus développée de la figure 2 (p. 26), appartient à une série de maïs cultivés dans le but de suivre la végétation dans les conditions que je viens de définir.

On peut constater que l'épi mâle n'est pas entièrement dégagé; tous les épillets sont garnis d'enveloppes florales; mais les étamines ne se sont pas formées.

Les fleurs femelles, dont l'évolution a très bien commencé en apparence, sont représentées uniquement par les feuilles ou bractées qui enveloppent l'inflorescence, et on constate sur une coupe longitudinale que l'épi se résout en pousse feuillée.

Cette plante est dans un état de dépérissement avancé, les feuilles sont desséchées en partie.

L'exsudat des plantes normales, les solutions diluées au 1/10.000 de fluorure de sodium, de borate de sodium, de sulfate d'alumine, d'iodure de potassium, etc., déposés en gouttelettes sur le limbe des feuilles saines, n'ont aucune action sur leur

couleur. Le fluorure de sodium détruit cependant les cellules sur une étendue de parenchyme correspondant à la largeur de la goutte de solution et s'étendant de l'endroit où elle a été déposée jusqu'à l'extrémité de la feuille.

Il résulte de ces faits que la solution ne renferme pas tous les éléments nécessaires au développement du maïs, et celui ou ceux qui font défaut semblent exercer une influence qui rappelle jusqu'à un certain point celle que j'ai attribuée au zinc.

La recherche des éléments complémentaires de la solution est une question qui doit aboutir sans peine à des résultats positifs.

Autres chloroses expérimentales du maïs.

Si l'on transporte des plantules de maïs obtenues par germination en présence d'eau distillée et à l'abri des microbes, dans des solutions pourvues d'un seul composé minéral alimentaire, on observe, entre autres faits intéressants, une chlorose très prononcée, qui se déclare au bout de deux ou trois semaines de végétation.

Pour suivre l'influence des divers sels minéraux susceptibles d'être employés comme aliments des plantes et même comme engrais chimiques, je les ai utilisés à la concentration de 1 p. 1.000 et de 0,5 p. 1.000 dans l'eau distillée pure ; les solutions étaient réparties dans des flacons de 2 litres.

Les nitrates, phosphates, sulfates et chlorures de potassium, de sodium et de calcium peuvent être employés indifféremment à la concentration de 1 ou de 0,5 p. 1.000 ; les sels ammoniacaux des mêmes acides ne sont pas tolérés au delà de 0,5 p. 1.000 au début.

La végétation évolue au début dans toutes les solutions ainsi constituées exactement comme dans l'eau distillée considérée comme milieu témoin.

Mais au bout de quinze jours environ, on constate la décoloration progressive des feuilles qui se forment par la suite.

La décoloration est plus rapide en présence des nitrates; ce sont généralement les nitrates de potassium et de calcium

qui devancent le nitrate d'ammonium et de sodium ; les sulfates et les chlorures sont moins rapides dans leurs effets, les phosphates viennent enfin avec une action plus lente et moins complète.

Les plantes qui végètent dans l'eau distillée ne se décolorent pas, même au bout de trois et quatre mois.

La chlorose observée dans ces conditions est due au manque de fer, car des gouttes d'azotate de fer en solution à 0,2 et 0,1 p. 1.000 provoquent la formation de la chlorophylle au bout de trois à quatre jours, à l'endroit où on les a déposées sur les feuilles décolorées. (V. planche IV, feuilles de gauche.)

Le fer a donc été soustrait à la plante par la solution incomplète, ce qui n'a rien d'étonnant ; il est certain, en effet, que la réserve de fer de la graine est assez grande pour alimenter un poids de plantes qui atteint plusieurs fois le poids de la graine. C'est ainsi que les choses se passent lorsque le maïs est placé dans une solution complète privée de fer ; la chlorose apparaît lorsque la plante a atteint un poids sec voisin de 3 grammes.

Dans les solutions incomplètes, le poids des plantules les plus lourdes ne dépasse pas sensiblement celui de la graine : ce sont celles qui végètent dans le nitrate de potassium et de calcium, qui atteignent les poids les plus élevés, en raison du développement énorme que prennent les racines (2 m. 20 en présence du nitrate de calcium).

Ce développement dépasse de beaucoup celui que l'on observe dans l'eau distillée, bien que la plantule y reste constamment verte.

Les sels ammoniacaux restreignent aussi, comme dans les solutions complètes, la surface du système radiculaire.

Ces observations prouvent que la réserve azotée de la graine peut être complétée avantageusement par le nitrate de calcium de préférence. C'est une indication pratique assez intéressante, surtout si l'on songe qu'une légère dose de nitrate de calcium donnée au moment des semailles favorise en même temps l'allongement des racines et permet à la plante d'explorer un volume de terre bien plus élevé.

ÉTUDE DE LA CHLOROSE DES VÉGÉTAUX SUPÉRIEURS ATTRIBUÉE A LA RICHESSE EXCESSIVE DES SOLS EN CALCAIRE

En collaboration avec M. RUOT et M. LEMOIGNE.

Les terrains calcaires ne conviennent pas à la culture d'un grand nombre d'espèces végétales, et, d'une manière générale, ces sols sont peu favorables à la culture intensive pour des raisons qu'on a mises en lumière, 2e mémoire, p. 678.

On connaît l'allure de la végétation chez des plantes calcifuges qu'on cherche à acclimater aux terrains riches en calcaire.

Parmi les plantes annuelles, c'est le lupin blanc qui offre le plus de résistance à cette accoutumance. Sa germination s'accomplit cependant à peu près régulièrement, et les premières feuilles qui se forment aux dépens des réserves séminales ne présentent rien d'anormal; mais quand la plantule a épuisé ces réserves, la végétation devient languissante; la plante périt avant d'avoir formé quelques fleurs. Le calcaire serait donc toxique vis-à-vis des plantes calcifuges.

La reconstitution d'une grande partie du vignoble français, à la suite du désastre causé par l'invasion phylloxérique, s'est heurtée à des obstacles de même nature.

Les cépages américains utilisés comme porte-greffes ou comme producteurs directs ne pouvaient pas prospérer en terrain calcaire; ils périssaient plus ou moins vite après avoir présenté les symptômes d'une chlorose intense.

Le mal ne pouvait être attribué qu'à l'absorption d'un excès de calcaire, et, ce qui le prouvait, c'est que les pousses et les feuilles chlorotiques étaient remplies de cristaux d'oxalate de calcium.

Cependant cette interprétation ne cadre pas avec d'autres faits d'observation courante.

Le sulfate de fer en cristaux, déposé au pied des ceps, prévient fréquemment la chlorose, mais seulement pendant un temps limité; il la fait disparaître plus sûrement si on l'introduit directement dans les tissus de la plante en badigeonnant

les sections des sarments au moment de la taille d'hiver avec une solution de sulfate de fer.

Entre la cause présumée du mal et le remède certain, les relations ne sont pas évidentes.

L'analyse des sols a montré aussi qu'il n'existe pas un rapport constant entre leur richesse en calcaire et leur aptitude à provoquer la chlorose. Il y a donc calcaire et calcaire. On a expliqué ces divergences par l'état de division plus ou moins grande des éléments du sol.

Nous n'insisterons pas sur ces interprétations, dans lesquelles on peut découvrir une part de vérité comme il s'en rencontre dans toutes celles qui doivent se borner à rapprocher les faits, faute de pouvoir en saisir la liaison.

On conçoit qu'après tout ce que l'un de nous a établi avec le concours d'une méthode souple et rigoureuse, nous pouvons aborder l'étude du rôle du calcaire dans la production de la chlorose, en tirant parti des faits acquis et des moyens de diagnostic des différentes chloroses végétales expérimentales ou naturelles.

Nous avons donc entrepris des recherches sur plusieurs espèces végétales simultanément, afin de mieux saisir les réactions spécifiques des plantes soumises aux mêmes conditions atmosphériques.

Le maïs résiste a la chlorose « calcaire ».

Si la richesse excessive de la sève en composés calciques est une cause de chlorose, il est facile de la provoquer chez une plante quelconque cultivée en solution minérale aseptique.

Il suffit de pousser jusqu'à la limite compatible avec le développement de la plante, la concentration de la liqueur nutritive en composés solubles du calcium.

Nous avons adopté pour le maïs la solution suivante :

Nitrate de calcium	1 »
Phosphate de potassium neutre à la phénolphtaléine	0,5
Sulfate de magnésium	0,1
Sulfate ferreux	0,05
Sulfate de zinc	0.01
Chlorure de manganèse	0,01
Silicate de potassium	0,01
Carbonate de calcium	2 »
Eau de source	1.000

Cette solution a été additionnée en outre de chlorure de calcium de façon à constituer quatre milieux nutritifs différents, pourvus respectivement de 0,5, 1, 1,5 et 2 p. 1.000 de $CaCl^2$. Comme plantes témoins, nous disposions des séries cultivées simultanément en 1912, dans les solutions de concentration variable en vue de la fructification. (Voir 3e mémoire, décembre 1913.)

Mises en flacon le 1er avril 1912, les plantes présentent dès les premiers jours un retard visible sur la série $P \times 1/2\ NO^3NH^4$, du 2 avril 1912.

Mais, fait inattendu, on ne note pas de différence sensible entre les divers lots de plantes qui ont reçu des doses variables de chlorure de calcium.

La photographie (Pl. I) prise le 9 mai montre l'état de la végétation comparée à un témoin, $P \times 1/2\ NO^3NH^4$.

Les organes aériens sont moins colorés que chez les témoins; par contre, les racines sont sensiblement plus développées.

Un caractère commun aux maïs placés dans les solutions calciques, c'est la coloration rouge violacée des gaines, de la tige et même des racines; sur celles-ci, le détail est visible dans la photographie; cette teinte indique l'alcalinisation progressive de la liqueur nutritive.

La photographie (Pl. II) du système radiculaire de deux plantes met en évidence un détail intéressant.

On peut constater que les racines manifestent une chimiotaxie négative pour le dépôt insoluble du fond, constitué par du carbonate et du phosphate de calcium.

Malgré cela, elles absorbent assez de fer pour conserver leur couleur verte. Celles qui parviennent jusqu'au dépôt en retiennent, par adhérence, des particules qu'elles entraînent vers la surface du liquide où elles viennent se ranger. C'est dans l'extrait insoluble ainsi suspendu que les poils absorbants puisent les petites quantités de fer et d'oxydes rares nécessaires à la plante.

Quand toute la place disponible est prise par les racines, les dernières formées se développent nécessairement dans la masse du dépôt; mais la chimiotaxie négative se traduit alors d'une autre façon; les ramifications des axes principaux s'orientent vers la surface du liquide et s'allongent dans ce sens.

Le calcium soluble étant déjà trop abondant, les racines fuient les régions où elles trouvent encore un surcroît de calcaire.

On voit donc que les racines trahissent toujours mieux que les organes aériens les défauts des solutions nutritives, quelle qu'en soit la nature.

Du côté des organes aériens, on n'observe pas de chlorose; la végétation progresse lentement et semble s'arrêter; mais elle reprend son évolution à partir du jour où on donne des solutions d'entretien; les épis mâles fournissent une pollinisation abondante; les épis femelles émettent des panaches de stigmates bien développés.

Une plante a formé 7 graines; elle appartient au lot qui a reçu 0,5 p. 1.000 de chlorure de calcium (n° 1 du tableau III).

Deux faits indiquent que la végétation a été gênée : la chute précoce des feuilles inférieures et le développement exagéré du système radiculaire. Ce sont là des symptômes qui trahissent une disette d'un ou de plusieurs éléments nécessaires à la plante. Nous sommes en mesure d'affirmer (3e mémoire) que l'eau est un de ces éléments ; la richesse exagérée des solutions en sels de calcium solubles justifie cette assertion; nous pouvons ajouter que les éléments rares sont difficilement absorbables, comme on le verra plus loin, pour les mêmes raisons, aggravées encore par la présence du carbonate de calcium. Le tableau III montre jusqu'à quel point le calcium soluble a nui à la végétation.

Tableau III.

CONCENTRATION des solutions en $CaCO^2$.	Nos d'ordre.	POIDS SEC des plantes en gr.	POIDS SEC des racines en gr.	POIDS des racines rapporté à 100 parties de plantes.
—	—	—	—	—
0,5 p. 1000. . .	1	39,977	12,061	30,2
1	2	27,528	7,804	28,3
	3	28,720	8,703	30 »
1,5	4	35,683	10,453	29,3
	5	18,628	4,730	25,4
2	6	26,453	8,787	34,3
	7	30,167	9,743	32,3

Comme on le voit, le poids du n° 1 est le plus élevé; dans les autres lots, les écarts ne sont pas en rapport avec la concentration de la solution nutritive en $CaCl^2$: les plantes atteignent

sensiblement le même poids ; le maïs présente donc une tolérance très grande pour des éléments très répandus dans le sol, et en absorbe des quantités bien supérieures à celles qu'il utilise réellement ; l'analyse des cendres montre que le chlore représente 15 p. 100 du poids des cendres de la tige, la chaux atteint le chiffre de 40 p. 100 des cendres des feuilles, l'acide oxalique est abondant dans les tiges ; cette teneur anormale en chlore et en chaux ralentit nécessairement le développement de la plante et diminue le poids de matière végétale ; on pouvait escompter *a priori* l'arrêt de la végétation par la concentration des solutions nutritives en chlorure de calcium ; c'est bien le résultat qu'on aurait observé si on n'avait pas introduit dans les flacons des solutions d'entretien qui ont dilué la liqueur résiduelle ; ces solutions avaient la même richesse en calcium soluble que les liqueurs nutritives correspondantes.

Chlorose « calcaire » du lupin blanc (*Lupinus albus*).

Le lupin blanc est la plante calcifuge par excellence ; il est très sensible à la chlorose « calcaire ». Nous l'avons donc utilisé d'abord de préférence à toute autre espèce végétale ; malheureusement, le lupin blanc se développe très mal dans les solutions minérales ; il ne réussit pas mieux lorsqu'on le cultive dans du sable blanc de Fontainebleau, imbibé d'une liqueur nutritive. Nous ne connaissons pas encore la composition d'un milieu artificiel qui conviendrait à la culture de cette plante ; et comme sa recherche exigera quelques années de travail, nous nous sommes bornés à faire quelques observations provisoires qui nous ont montré que le lupin ne devient chlorotique qu'en présence de carbonate de calcium. Les sels de calcium solubles, et par conséquent absorbables, ne produisent pas de chlorose ; c'est donc le calcaire qui semble être l'agent plus ou moins médiat de cette maladie physiologique. Comme le lupin ne nous permettait pas de formuler de conclusions définitives, nous nous sommes adressés à la vesce de Narbonne (*Viscia narbonensis*).

Chlorose « calcaire » de la vesce de Narbonne (*Viscia narbonensis*).

Cette plante se développe bien dans les solutions minérales que nous avons préparées en vue de nos recherches; son évolution rapide et luxuriante va jusqu'à la production de fleurs et de fruits; nous devons cependant ajouter que la concentration de la liqueur nutritive lui devient fatale à bref délai; la plante ne meurt pas; mais son développement s'arrête; l'apparition de ce moment critique se signale par l'aspect du bourgeon terminal qui dégénère en « tête de chou », dont les feuilles gaufrées et recroquevillées restent stationnaires pendant des semaines. L'accident est d'autant plus précoce que le volume initial de la solution nutritive est plus réduit; quand on emploie des flacons de 2 litres de capacité, la plante peut former des fleurs et des gousses normales avant l'arrêt de la végétation. Si on dilue la liqueur résiduelle avec de l'eau distillée, la végétation ne reprend pas son activité; il s'agit donc en réalité d'un défaut de constitution de la solution nutritive dû à l'absence d'un élément indispensable à la plante ou, plus vraisemblablement, à la non-observation de la loi des rapports physiologiques, car l'accident se produit aussi lorsque la solution est préparée avec de l'eau de source (1).

La solution nutritive que nous avons employée possède la composition suivante :

Nitrate de calcium	1 »
Phosphate de potassium ramené au voisinage de la neutralité à la phénolphtaléine	0,250
Sulfate d'ammonium	0.2
Sulfate de magnésium	0,05
Sulfate ferreux	0,025
Chlorure de calcium	0,05
Sulfate de potassium	0,025
Sulfate d'aluminium	0.025
Chlorure de manganèse	0,05
Chlorure de zinc	traces
Eau de source	1.000

1) Nous n'avons jusqu'ici aucune raison d'attribuer l'arrêt brusque de la végétation à l'accumulation de produits toxiques excrétés par les racines.

Dans ce milieu préalablement stérilisé à 120 degrés, les plantes atteignent un poids sec de 3 grammes. Quelques pieds produisent des graines qui ne parviennent pas à la maturation par suite de l'arrêt brusque de la végétation ; mais la chlorose que nous cherchons à provoquer se déclare toujours bien avant que cet accident ne survienne.

L'influence du carbonate de calcium dans la production de la chlorose est encore décisive. Dans les solutions privées de carbonate, la vesce de Narbonne ne devient jamais chlorotique ; la décoloration des feuilles s'observe régulièrement en présence de carbonate de calcium. Les plantes malades perdent leurs feuilles inférieures ; les témoins les conservent jusqu'à la fin de l'expérience.

Pour déterminer la nature de la chlorose, nous avons eu recours au procédé ordinaire, qui consiste, on se le rappelle, à déposer des gouttes de sulfate d'ammonium ou de nitrate de fer à 0,1 p. 1000 sur les feuilles décolorées. Le fer seul fait reverdir le parenchyme à l'endroit où la goutte a abandonné des traces de fer, en s'évaporant.

Deux séries de cultures faites avec la vesce au cours du printemps et de l'été de 1912 nous ont donné des résultats concordants.

Nous avons étendu nos observations au carbonate de magnésium, qui provoque les mêmes accidents que le carbonate de calcium ; il en est de même du carbonate de baryum ; mais nous n'avons pas fait le départ entre la toxicité de ce dernier pour la vesce et son action purement chimique ; pour cette raison, nous ne tiendrons pas compte des résultats qu'il nous a fournis.

La conclusion qui se dégage de ces faits est simple : le carbonate de calcium rend la vesce chlorotique en la privant de fer.

Dans une solution pourvue de carbonate de calcium ou de magnésium, le fer est insolubilisé ; le maïs est capable de le dissoudre et de l'absorber, la vesce ne peut pas l'incorporer sous cet état ; il est légitime de mettre ce résultat sur le compte des sécrétions des racines ; celles du maïs restent acides et dissolvent le fer à l'endroit précis où il doit être assimilé ; si la vesce devient chlorotique, c'est que ces sécrétions radiculaires sont alcalines.

Ces faits prouvent en outre que l'absorption d'un excès de calcaire par la plante n'est pas la cause de la chlorose; dans les solutions privées de carbonate, le calcium soluble est aussi abondant que dans celles qui en sont pourvues; l'analyse permettra facilement de vérifier la richesse des deux séries de plantes en calcium.

Notre but pour le moment est de définir les conditions, les causes et la nature de la chlorose calcaire.

Le lupin, plante calcifuge, ne nous a pas permis de pousser assez loin notre démonstration ; c'est la vesce, plante calcicole, qui nous permet d'aboutir au résultat; le fait peut paraître surprenant, si l'on ne remarque pas que les conditions imposées à la plante sont plus sévères que celles que réalisent les sols les plus riches en calcaires.

La solution est saturée de bicarbonate de calcium; elle renferme plus de nitrate, de chlorure et de sulfate de calcium que les sols crayeux, dont les eaux d'imbibition sont peu riches en sels solubles de calcium, le bicarbonate mis à part.

Chlorose calcaire du pois (*Pisum sativum*). Influence des excrétions des racines sur l'absorption du fer en présence du carbonate de calcium.

Nous avons attribué aux excrétions des racines une influence prépondérante dans « l'étiologie » de la chlorose calcaire; rien n'est plus aisé que d'en donner la preuve expérimentale.

Pour cela, nous avons utilisé la vesce et le pois (variété *caractacus*). Il convient donc d'exposer tout d'abord les conditions dans lesquelles ce dernier devient chlorotique.

Nous l'avons cultivé dans les solutions nutritives suivantes, en flacons de 2 litres.

La solution II est celle que E. Laurent a utilisée pour la culture du pois diluée à 1/2 (1).

Additionnées de carbonate de calcium à 2 p. 1.000, ces solutions devaient produire la chlorose des pois conformément aux observations que nous avons faites sur la vesce et le lupin; les solu-

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. V, p. 105.

tions privées de carbonate constituaient ainsi des milieux témoins.

	I	II	III	IV
		—	—	—
Nitrate de calcium	0,5	0,5	0,5	0,5
Phosphate de potassium (1)	0,125	»	»	0,25
Sulfate d'ammonium	0,10	»	0,1	0,2
Sulfate de magnésium	0,025	0,25	0,2	0,1
Sulfate ferreux	0,0125	0,005	0,1025	0,025
Chlorure de calcium	0,05	»	0,1	0,1
Silicate de potassium	0,0125	»	»	0,025
Sulfate d'aluminium	0,0125	»	»	»
Chlorure de manganèse	0,0125	»	0,025	0,025
Chlorure de zinc	traces	»	»	traces
Eau de source	1.000	1.000	1.000	1.000
Sulfate de potassium	»	0,25	0,2	»
Sulfate de calcium	»	0,25	»	»
Phosphate tricalcique	»	0,25	0,5	»
Chlorure de sodium	»	0,25	»	»

Mais les résultats n'ont pas été conformes à nos prévisions; la chlorose a sévi sur tous les lots de plantes. Celles qui étaient alimentées par la solution II ont présenté les symptômes de la chlorose avec un retard de cinq jours sur les autres; et leurs feuilles n'ont pas été aussi complètement décolorées.

Le carbonate de calcium hâte l'apparition de la maladie de un à dix jours; en sa présence la chlorose est plus intense; la mort de la plante survient plus tôt.

Nos cultures, faites sous un abri vitré ouvert sur les quatre faces, ont été favorisées par le beau temps. Commencées le 8 août 1913, elles se sont poursuivies jusqu'à la dernière quinzaine de septembre.

Les conditions atmosphériques exercent une influence très grande sur la marche de la maladie. Plus la végétation est rapide, plus vite elle apparaît.

Dans nos derniers essais, les premiers symptômes se sont montrés le dixième jour qui a suivi la mise en flacons. Peu de temps après, les premières fleurs se sont formées; toutes les plantes ont fleuri, bien que les feuilles fussent entièrement décolorées; les quatre ou cinq premières feuilles normales et

(1) Le phosphate de potassium est ramené à une réaction faiblement acide à la phénolphtaléine.

très vertes suffisaient à l'entretien des organes chlorotiques.

Les racines permettent de prévoir l'éclosion de la maladie deux ou trois jours avant qu'elle ne se manifeste du côté des organes aériens. Elles prennent une teinte rosée qui affecte aussi la solution. Cette teinte s'accentue avec les progrès du mal ; le même symptôme s'observe chez la vesce. A partir du moment où la chlorose peut être considérée comme définitive, les racines cessent de s'allonger.

Les organes aériens se développent plus longtemps; mais les feuilles se réduisent de plus en plus; la végétation s'arrête, et quelques jours après les plantes périssent.

Nous avons vérifié l'efficacité de l'azotate de fer comme remède à la maladie, aussi bien sur les plantes qui végétaient dans les solutions privées de carbonate de calcium, que sur celles qui se développaient dans les milieux additionnés de carbonate.

Le sulfate d'ammonium reste dans tous les cas sans action sur la maladie ; les solutions sont en effet très riches en sulfates.

La généralisation de la chlorose chez les plantes qui sont cultivées dans les solutions privées de carbonate de calcium est un fait qui doit être discuté.

Nous avons constaté en effet que le lupin blanc et la vesce ne deviennent chlorotiques qu'en présence de carbonate de calcium; les nitrate et chlorure de calcium sont inoffensifs. La conclusion ne s'accorde plus avec les faits observés sur le pois, du moins en apparence.

Il semble pourtant que les excrétions radiculaires du pois possèdent la propriété d'insolubiliser le fer, puisque la chlorose est due à la pénurie de fer; et, d'autre part, les symptômes relevés du côté de l'appareil radiculaire sont communs à toutes les plantes malades.

Il est donc vraisemblable que la chaux absorbée à l'état de nitrate est éliminée dans la région des poils absorbants à l'état de carbonate, qui insolubilise le fer à l'endroit même où il doit être absorbé.

L'expérience justifie cette interprétation comme on va le voir.

Il s'agit de vérifier maintenant l'influence des acides organiques excrétés par les racines sur l'absorption du fer.

L'un de nous a montré que le maïs laisse diffuser de l'acide malique dans les solutions nutritives. Il est probable que chaque espèce végétale excrète ainsi les acides organiques qui circulent dans sa sève; nous n'avons pas déterminé la nature des acides du pois et de la vesce; nous nous sommes bornés à introduire dans les liqueurs nutritives de petites quantités d'acide tartrique ou citrique parce que ces deux acides sont très répandus aussi chez les végétaux supérieurs; ils possèdent comme l'acide malique la propriété de dissoudre le fer en présence de carbonate de calcium.

Nous avons donc introduit dans les solutions minérales, au moment où la chlorose était bien prononcée, l'une des solutions suivantes :

a)	Tartrate double de potassium et sodium	10 gr.
	Acide tartrique	1 gr.
	Eau distillée	100 gr.
b)	Citrate de sodium	10 gr.
	Acide tartrique	1 gr.
	Eau distillée	100 gr.

en quantité suffisante pour obtenir une concentration de 0,1 p. 1.000 en sel et 0,01 p. 1.000 en acide, par litre de solution nutritive.

Le même traitement a été réalisé sur des vesces en même temps que sur les pois; son résultat ne s'est pas fait attendre.

Les vesces chlorotiques reprennent leur couleur verte au bout de trois jours environ; les conditions atmosphériques particulièrement favorables ont exercé une influence très heureuse sur la rapidité de la guérison.

Les symptômes de la chlorose disparaissent en même temps sur les feuilles et les racines; la solution nutritive redevient incolore et de nouvelles racines se forment sur les anciennes.

Les plantes traitées continuent de se développer comme les témoins jusqu'au moment où la végétation s'arrête pour les raisons que nous avons indiquées.

Les plantes non traitées perdent leurs feuilles et succombent.

L'influence du traitement se traduit de la même manière sur les pois ; toutes les plantes traitées reverdissent au bout de trois, quatre jours; la solution se décolore et les racines forment de nouvelles ramifications. Les plantes guéries atteignent des

poids plus élevés que celles dont les solutions n'ont pas reçu d'acide organique.

Quelques-unes parmi les premières portent deux gousses renfermant deux ou trois graines bien développées; le poids sec maximum observé est de 1,962 grammes.

La guérison est aussi rapide chez les plantes dont les solutions sont privées de carbonate de calcium que chez celles qui végètent en présence de ce corps; mais les poids secs de ces dernières sont plus faibles.

Pourvues ou non de carbonate de calcium, les quatre solutions utilisées ont donc provoqué l'étiolement du pois suivant des processus identiques, puisque la maladie se présente partout avec les mêmes symptômes et cède au même traitement.

L'acide tartrique et l'acide citrique se sont montrés également efficaces : ils ont dissous de petites quantités de fer même en présence de carbonate de calcium, et l'ont mis à la disposition de la plante sous un état absorbable.

Nous avons donc empêché la plante de dissoudre le fer en la plaçant dans des solutions qui rendent ses excrétions radiculaires alcalines ; mais nous avons corrigé les effets de cette mesure en introduisant dans les solutions les acides libres que la plante ne pouvait plus y déverser.

L'excrétion d'acides organiques est donc le moyen que les racines emploient pour emprunter aux sols calcaires les éléments terreux qui ne peuvent y exister qu'à l'état insoluble.

Nous pouvons donc prévoir théoriquement l'existence de divers accidents de végétation autres que ceux qui découlent de la pénurie de fer. La chlorose « calcaire » peut être compliquée de disette de manganèse, autre cause d'étiolement dont l'un de nous a précisé le mécanisme (p. 36), de disette de zinc qui se manifeste par la mort rapide des plantules et vraisemblablement de pénurie d'autres éléments qui restent encore à déterminer.

Une chlorose réfractaire au traitement ferrique ou sulfurique peut céder à d'autres interventions visant le manganèse, le zinc ou les éléments provisoirement inconnus.

Nous devons ouvrir maintenant une parenthèse au sujet de la résistance absolue du maïs à la chlorose. Le maïs alcalinise

aussi ses solutions nutritives ; on ne conçoit donc pas qu'il se montre réfractaire aux conditions sévères que nous lui avons imposées.

Nous savons qu'à côté du carbonate de calcium ou de sodium ses racines éliminent des malates ; la présence de ces derniers suffit pour former des sels doubles avec les éléments terreux.

Nous ne voyons pas, en outre, pour quelle raison l'acide malique libre ne suivrait pas le même chemin que les malates, pour se combiner aussitôt à l'oxyde de fer qui est directement en contact avec les poils absorbants. Rien ne s'y oppose, et c'est vraisemblablement dans cette combustion incomplète des acides organiques par les racines que réside le mécanisme ultime de la résistance absolue à la chlorose.

Par analogie, nous sommes conduits à émettre l'hypothèse que les excrétions des plantes calcifuges sont faiblement alcalines.

L'assertion est téméraire si on considère que la sève de l'*Oxalis corniculata*, des *Rumex acetosa* et *acetosella* est fortement acide ; mais il s'agit ici d'acide oxalique dont l'action est neutralisée par le carbonate de calcium, en admettant qu'il se diffuse à travers les membranes des poils absorbants.

Les faits tendent plutôt à prouver que l'acide oxalique est brûlé entièrement par les racines. Les trois espèces que nous avons citées végètent dans les « terres de bruyère » ou dans les sols humides privés de calcaire : elles s'adaptent vraisemblablement à l'absorption de l'humus, qui est un aliment carboné des végétaux supérieurs capables de le dissoudre par *leurs excrétions alcalines*.

Le mécanisme de l'accoutumance au sol s'expliquerait ainsi très simplement.

Dans les terrains calcaires prospèrent les plantes à excrétions radiculaires acides, tandis que les sols acides ou tourbeux ne peuvent convenir qu'aux végétaux dont les racines laissent diffuser du carbonate de sodium.

Si nous revenons maintenant à la chlorose de la vigne que nous avons surtout visée, quoique par des moyens détournés, nous pouvons assimiler la résistance des cépages français à celle que nous avons constatée chez le maïs ; les cépages américains se rapprochent au contraire des plantes calcifuges, ou

plus exactement peut-être du pois et de la vesce ; nous avons aussi le droit de conclure que la résistance absolue ou « immunité naturelle » et la réceptivité plus ou moins grande à la chlorose « calcaire » relèvent simplement de la réaction des excrétions radiculaires.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les conclusions qui se dégagent des faits exposés dans ce mémoire, se rattachent à la physiologie générale ; elles sont donc d'ordre théorique ; mais une étude complète de la nutrition des végétaux supérieurs, bien qu'abordée par son côté théorique, aboutit en dernier ressort à des principes destinés à servir de base aux règles de la pratique agricole.

Ce sont ces principes que je résume d'abord.

J'ai montré que le calcaire joue un rôle nuisible sur la végétation, lorsqu'il est assez abondant dans le sol pour troubler la loi des rapports physiologiques (1). Mais il constitue un aliment de la plante, et il exerce une influence heureuse sur son développement en assurant l'insolubilité des oxydes rares, indispensables ou non aux végétaux supérieurs, toujours toxiques lorsque l'eau d'imbibition du sol en dissout des traces sensibles.

Cette dernière propriété comporte cependant une action défavorable lorsqu'elle va jusqu'à priver la plante d'éléments comme le fer, le manganèse, le zinc.

Telles sont les fonctions nombreuses qui sont dévolues au calcaire dans les relations de la plante avec le sol, indépendamment de son action sur la combustion des matières organiques par les microbes.

Son utilité est plutôt liée à sa rareté relative.

Un sol qui renferme 1 p. 100 de calcaire en est suffisamment pourvu ; mais il peut en contenir bien plus sans accuser une diminution de fertilité, au contraire ; tout dépend des proportions relatives des autres éléments qui entrent dans sa composition.

Mais ces proportions commandent les propriétés physiques

1. Deuxième mémoire, p. 678.

du sol que je n'ai pas à envisager ici; il suffit, pour le moment, que le calcaire puisse remplir largement les fonctions utiles que je viens de résumer.

Celles-ci tendent dans tous les cas à placer la plante dans la nécessité d'emprunter un grand nombre de ses éléments minéraux à des composés insolubles.

En présence de calcaire, l'acide phosphorique, le fer, le manganèse, le zinc, la silice ne peuvent être absorbés qu'à la suite d'une action dissolvante due aux excrétions radiculaires.

Ces excrétions sont acides ou alcalines; la réaction basique est la plus fréquente dans les conditions naturelles parce que la plus grande partie de l'azote utilisé se trouve à l'état de nitrate.

Un excès de calcaire augmente la présence de carbonate de calcium dans les excrétions radiculaires et réduit nécessairement leur pouvoir dissolvant; l'absorption d'acide phosphorique, de fer, de manganèse, de zinc devient alors impossible (lupin, pois, vesce) ou difficile (maïs).

On peut atténuer ces conséquences par les labours : les sols bien divisés sont ceux qui présentent aux racines la plus grande surface de contact non colmatée; par l'emploi des superphosphates qui dans les terrains calcaires commencent par enrober le carbonate de calcium d'une couche de phosphate tribasique, lequel se laisse, sans doute, immobiliser à son tour, comme l'ont montré MM. Müntz et Gaudechon, par le travail d'incrustation des eaux d'infiltration (1).

Il existe enfin un autre correctif efficace des terrains calcaires : ce sont les fumures organiques.

L'humus est un agent d'enrobage aussi efficace que le calcaire et il possède précisément la propriété de se fixer sur ce dernier; mais la combinaison de l'humus et de la chaux est facilement attaquée par les microbes; les acides organiques sont des produits constants de la décomposition de l'humus, et comme ces fermentations sont favorisées par le calcaire même, la solubilisation des oxydes terreux est possible en présence de carbonate de calcium.

Ce sont là des faits dont la pratique a toujours tiré un parti

1. *Annales de la Science agronomique*, 1912, 2e semestre, n° 3, p. 200.

avantageux bien qu'ils n'aient pas été mis en lumière dans toute leur étendue par la science.

Si l'on considère maintenant les autres éléments indispensables aux végétaux supérieurs, nous savons que l'azote, le potassium, le soufre, le calcium, le magnésium, le chlore se rencontrent à l'état soluble dans tous les sols arables.

Mais la richesse de la solution qu'ils constituent, avec l'eau d'imbibition retenue par la terre, est bien inférieure à celle que j'ai réalisée dans mes solutions nutritives.

Il faut donc admettre que la plante solubilise une fraction importante des substances qu'elle emprunte au sol, puisque la quantité d'eau évaporée pour produire 1 kilogramme de matière végétale est constante pour une espèce donnée.

Nous connaissons les moyens qu'elle met en œuvre pour atteindre ce résultat, et nous savons aussi que le travail de solubilisation accompli par les excrétions des racines est considérablement augmenté par la présence de composés solubles, qui laissent un résidu acide ou alcalin. Des sels tels que le chlorure de sodium peuvent même remplir ce rôle (2e mémoire, p. 679).

Pour se conformer à ces principes, les praticiens doivent chercher avant tout à favoriser l'action dissolvante des racines, en leur fournissant les engrais appropriés et en étendant le plus possible leur rayon d'action.

La réaction des excrétions est fixée par la nature des résidus inutilisables pour la plante; mais dans la terre cette réaction a beaucoup moins d'importance que dans les milieux artificiels, à moins que le calcaire fasse défaut; les sels ammoniacaux sont alors contre-indiqués.

Cette condition mise à part, tous les engrais azotés minéraux se valent, à dose égale d'azote.

Mais si on envisage l'autre face du problème, qui comporte un développement vigoureux des organes souterrains, il est nécessaire de faire un choix entre les divers engrais azotés.

Ce sont les nitrates qui influencent le plus favorablement l'allongement et la ramification des racines, et parmi eux c'est le nitrate de calcium qui se place au premier rang. Les sels ammoniacaux réduisent au contraire le développement des organes souterrains. Le fait a été mis en évidence depuis long-

temps par les remarquables travaux de Lawes et Gilbert, qui ont très judicieusement attribué à cette particularité l'abaissement considérable des récoltes qui reçoivent du sulfate d'ammonium pendant les années de sécheresse persistante.

Il faut pourtant se garder d'employer de fortes doses de nitrates dès la germination ; le développement des racines est en raison inverse de la fertilité du sol. Une faible fumure azotée suffit, lorsque le sol est pauvre en substances nitrifiables ; les terres bien entretenues peuvent s'en passer.

Il est superflu d'ajouter que la profondeur des labours et l'émiettement des particules terreuses sont des conditions indispensables à la pénétration des racines.

Le développement vigoureux de ces organes étant assuré dès la germination, il faut leur constituer un milieu nutritif en tenant compte de la loi des rapports physiologiques ; la chose est malaisée (voir 2e mémoire, p. 677). Il faut compter avec les réserves minérales et surtout organiques, avec la richesse du sol en calcaire.

La théorie n'a pas orienté jusqu'ici la pratique dans cette voie. Elle s'est crue autorisée à insister sur le pouvoir absorbant du sol ; son insistance est légitime puisque ce pouvoir absorbant permet de constituer des réserves d'éléments fertilisants.

Mais les réserves ne peuvent être mises en œuvre qu'avec le concours d'un certain nombre d'éléments solubles qui constituent ce qu'on est convenu d'appeler un engrais complet.

Ce mélange doit remplir un double but : apporter un complément d'aliments minéraux et assurer, par voie de conséquence, l'absorption des substances insolubles, de façon à mettre à la disposition de la plante, à un moment quelconque de son évolution, tous les éléments indispensables, dans les proportions définies par la loi des rapports physiologiques.

Cette fumure complémentaire est, en somme, une *fumure active* ; si elle fait défaut, le sol le plus riche en réserves insolubles demeure improductif, car la plante ne peut pas attaquer ces réserves.

L'inanité des déductions analytiques devient évidente à la lumière de ces résultats.

Ils condamnent aussi l'usage d'un seul engrais chimique toutes les fois qu'il ne vise pas uniquement la loi des rapports

physiologiques, condition sur laquelle une connaissance approfondie du terrain, basée sur une longue observation, permet seule de se renseigner.

Toute la science du cultivateur consiste à tirer parti de ces observations délicates.

La *fumure active* varie avec l'espèce végétale; c'est la quantité d'eau nécessaire à l'élaboration d'un kilogramme de matière végétale qui fixe son importance; plus elle est élevée, moins la solution nutritive du sol doit être concentrée. Les cultures qui évaporent le plus d'eau s'accommodent le mieux des sols pauvres, et des faibles fumures; sous ce rapport, les légumineuses sont moins exigeantes que les graminées, si l'eau est offerte à discrétion. C'est une notion aussi ancienne que celle de l'assolément.

Dans l'ordre théorique, les résultats obtenus montrent, comme ceux que j'ai déjà exposés dans les mémoires précédents, tout le parti que l'on peut tirer de la méthode que j'ai mise en œuvre. On conçoit, en effet, qu'elle s'est bornée jusqu'ici à montrer la voie et à multiplier les procédés d'investigation qui permettront d'aborder toutes les questions que soulèvent l'agriculture générale et la physiologie.

Nous savons, en effet, que chaque espèce végétale exige une solution nutritive spéciale, par les proportions d'éléments qui la composent plus que par le nombre de corps qui y entrent.

La détermination de ces rapports et la fixation du nombre de corps simples indispensables à une plante sont une besogne délicate, mais non impossible, comme on a pu s'en rendre compte.

Elle deviendra aussi simple dans sa réalisation que la recherche d'une espèce chimique par la voie dichotomique, lorsqu'on aura déterminé les caractères physiologiques qui dénotent la présence ou l'absence d'un élément utile dans la solution.

Le manque de soufre, de fer, de manganèse, se reconnaît à des aspects bien définis de la végétation et se vérifie par des procédés aussi simples que précis.

La privation de zinc se traduit autrement, mais elle se manifeste par des caractères aussi constants et aussi évidents.

Il est vraisemblable que l'absence des autres éléments de la

solution nutritive pourra se reconnaître par des moyens spécifiques. Si je n'ai pas réussi à les découvrir jusqu'à présent, c'est parce que la suppression des éléments qui interviennent à dose massive condamne les organes aériens à une existence éphémère.

Le rôle du soufre, du fer et du manganèse dans la production de la chlorophylle est un fait sur lequel je dois insister.

Il montre que les éléments minéraux des végétaux supérieurs doivent être classés en deux catégories : ceux qui sont nécessaires à la vie végétative, et ceux qui interviennent en même temps, d'une manière directe, dans l'assimilation carbonique.

Le soufre et le fer appartiennent à cette dernière catégorie; le manganèse doit être rangé dans le premier groupe, bien que sa suppression, dans la liqueur minérale, provoque une chlorose prononcée du végétal; mais elle n'est pas identique à celle qui résulte de la privation de fer et de soufre et elle est susceptible d'être guérie par une substance organique qui existe dans l'exsudat des feuilles normales ou dans leur macération aqueuse, mais non pas directement par les composés minéraux du manganèse.

Il est vraisemblable, je le répète, que la privation d'un élément minéral quelconque, nécessaire à la vie végétative de la cellule, conduirait au même résultat si l'existence des feuilles n'en devenait trop précaire.

La matière organique chlorogène que j'ai mise en évidence est une substance élaborée par la cellule. Cela montre que les corps chlorophylliens forment avec cette dernière une symbiose très étroite, qui d'ailleurs est évidente, et c'est ainsi qu'il faut interpréter l'opinion suivant laquelle tous les éléments minéraux nécessaires à la plante ont un rôle à jouer dans l'assimilation carbonique.

On sait depuis longtemps que le manque de fer entraîne la disparition de la chlorophylle et on en a d'abord conclu que la chlorophylle renferme du fer. L'analyse a montré que cette déduction est inexacte; je n'affirmerai donc pas non plus que la chlorophylle renferme du soufre puisque l'analyse ne l'y a pas découvert, ni qu'elle contient dans sa molécule la substance chlorogène élaborée; mais je déduirai de mes observa-

tions que le soufre, le fer, la matière organique élaborée sont des aliments des leucites; j'ajouterai qu'il n'y a jusqu'ici aucune raison de considérer la chlorophylle comme un facteur déterminant de l'assimilation carbonique à la lumière, puisqu'elle ne se forme pas en l'absence de corps qui n'entrent pas dans sa composition.

Cette dernière particularité suffirait au contraire à la faire considérer comme un produit résultant de l'activité des corps chlorophylliens, si un nombre énorme de travaux ne lui avaient attribué une place que des coïncidences, des rapprochements aidés d'hypothèses, justifient seuls.

Pour appuyer cette conception, qui n'est pas neuve, il faut des faits plus probants, car elle n'a pas été bien accueillie par les physiologistes.

La décomposition du gaz carbonique par les végétaux supérieurs exposés à la lumière se présente donc comme une fonction complexe puisqu'elle dépend de la vie végétative et qu'elle exige en outre des éléments minéraux.

Il en est de même de toutes les grandes fonctions de la cellule vivante.

C'est le moment de rappeler que la production d'acides organiques par voie de désassimilation, ou, ce qui revient au même, par voie de combustion respiratoire limitée, peut être provoquée par la suppression d'un élément quelconque indispensable à la cellule. Si l'on supprime, ou si l'on réduit l'un des corps qui forment la solution de Raulin, en maintenant constante la dose de sucre, on observe la production d'acide citrique par un *citromyces* cultivé sur le milieu ainsi modifié, alors que sur la liqueur normale il n'en produit pas de trace.

L'acide prend naissance au moment où l'élément réduit ou supprimé fait complètement défaut. Pour continuer leur évolution, les parties jeunes du mycélium empruntent le corps qui manque aux vieilles cellules, et c'est alors seulement que l'acide citrique s'accumule dans la liqueur nutritive en présence d'un excès de sucres, aliments carbonés supérieurs à l'acide citrique.

De même, si on place comme l'a fait F. Ehrlich (1), un poids

(1) *Biochemische Zeitschrift*, t. XVIII, fasc. 3, 4 et 5, 1909.

relativement élevé de cellules de levure jeunes et vigoureuses dans une solution sucrée qui renferme un acide aminé comme aliment azoté, la levure emprunte son azote à l'acide aminé et laisse le résidu correspondant, alcool ou acide, parce que ce résidu est un aliment carboné inférieur aux sucres.

Mais quand on cherche à reproduire par les sucs cellulaires ces séries d'actions chimiques complexes, on n'obtient pas de résultats.

Lorsqu'on détruit l'édifice cellulaire, on anéantit en même temps ses fonctions essentielles.

Quelques-unes persistent cependant; ce sont celles qui relèvent d'un travail de digestion.

Mais là encore le déterminisme du phénomène n'est pas simple.

On sait qu'il exige des substances albuminoïdes des éléments minéraux, sous un état chimique convenable, et une réaction déterminée en grandeur et en nature; en un mot, c'est tout le suc cellulaire qui y participe.

Plus on pénètre le mécanisme des actions diastasiques les plus simples, plus le nombre d'éléments qui y concourent apparaît plus grand, et si on parvenait à séparer successivement tous les corps définis du suc cellulaire, on constaterait que les sensibilisatrices, les compléments, les kinases, etc., qui interviennent dans une réaction diastasique sont multiples.

Les actions diastasiques ont été assimilées aux actions catalytiques simples de la chimie générale; il y a entre ces deux ordres de phénomènes des analogies frappantes. Mais la chimie de la cellule est une chimie à déterminants multiples: ses réactions les plus simples exigent le concours de plusieurs facteurs, et, si l'on veut observer toutes les transformations qui relèvent de ses lois, il est nécessaire de recourir de préférence à la dissociation des fonctions en faisant vivre la cellule dans des conditions appropriées.

EXPLICATION DES PLANCHES. — 4e MÉMOIRE.

Planche I.

Culture du maïs en présence d'un excès de composés calciques solubles.

De gauche à droite :
Solution $(NO^3)^2Ca$ 1 p. 1.000 + 2 p. 1.000 de $CaCl^2$.
Solution $(NO^3)^2Ca$ 1 p. 1.000 + 1,5 p. 1.000 de $CaCl^2$.
Solution P × 1/2 NO^3NH^4 sans $CaCl^2$. Plante témoin.
Solution $(NO^3)^2Ca$ 1 p. 1.000 + 1 p. 1.000 $CaCl^2$.
Solution $(NO^3)^2Ca$ 1 p. 1.000 + 0,5 p. 1.000 $CaCl^2$.

Planche II.

Figure montrant la disposition des racines dans les solutions pourvues de 1 p. 1.000 (à gauche) et de 0,5 p. 1.000 de $CaCl^2$ (à droite).

Leur tassement dans les régions supérieures du liquide est dû à une chimiotaxie négative pour le dépôt insoluble riche en composés calciques.

Planche III.

Chlorose expérimentale du maïs, d'après des photographies en couleurs.

De gauche à droite.

1. Plante en milieu privé de fer.
2. Plante témoin très verte bien qu'elle soit privée de chlore.
3. Plante cultivée dans une solution à 0,5 p. 1.000 de nitrate de potassium dans l'eau distillée pure.
4. Plante en milieu privé de soufre.

Planche IV.

De gauche à droite.

1 et 2. Deux feuilles chlorotiques d'une plante cultivée en solution incomplète à 0,5 p. 1.000 de NO^3K, montrant les taches vertes produites par des gouttes de solution d'azotate de fer à 0,4 p. 1.000. Les taches sont à peu près limitées aux cellules qui ont reçu les traces de fer; les cellules détruites ont été lésées par la pointe de la pipette.

2 et 3. Deux feuilles chlorotiques d'une plante privée de manganèse montrant les taches vertes produites par l'eau d'exsudation des plantes normales ; les taches récentes sont circulaires ; les taches anciennes se sont étendues dans le sens de la circulation de la sève.

SUR L'ÉVOLUTION CULTURALE DES DERMATOPHYTES

par M. L. CAZALBOU

Si les remarquables travaux de Grüby ont fait connaître la nature réelle des Teignes, il a fallu l'apparition des méthodes pastoriennes pour isoler et différencier les agents de ces affections. A l'heure actuelle, la diagnose de ces champignons a pour base essentielle les caractères objectifs fournis par les cultures; mais, au point de vue botanique, nos connaissances sont encore imparfaites et les travaux de Matruchot et Dassonville sur le rattachement des Dermatophytes aux Gymnoascées, n'ont pas entraîné la conviction générale.

Nous nous proposons de donner ici quelques vues nouvelles sur la question et de faire connaître les premiers résultats obtenus; ces résultats sont, croyons-nous, de nature à ouvrir la voie vers la solution du problème posé par la systématique des Teignes.

Caractères généraux des cultures.

Sur les milieux d'épreuve formulés par Sabouraud, les parasites dont nous nous occupons se présentent généralement sous l'aspect d'un tapis de duvet blanc. Cependant la production de ce duvet offre les modalités suivantes :

1° Certaines espèces acquièrent immédiatement tout leur développement.

Exemple : *Trichophyton equinum*, — *Microsporon tomentosum*, — *Achorion Quinckeanum*.

2° D'autres Dermatophytes montrent tout d'abord un premier duvet assez court auquel se substitue une forme plus longue, désignée par les dermatologistes sous le nom de culture secondaire ou pléomorphique.

Exemple : *Tr. crateriforme*, — *M. Audouïni*.

3° Un certain nombre d'espèces, primitivement plâtreuses

ou granuleuses, se recouvrent ensuite de la culture duveteuse définitive.

Exemple : les *Tr. gypseum*.

4° Chez quelques parasites enfin, la culture est tout d'abord glabre ; le duvet final peut survenir tout de suite après, comme chez *Tr. violaceum*, — *A. Schönleinii*, ou être précédé de l'apparition d'un duvet plus court et plus rare, comme chez *M. equinum*.

De ces premières constatations, il semble ressortir que, si les espèces de la première série acquièrent, dès leur naissance, tout le développement duveteux dont elles sont susceptibles sur nos milieux, les autres, dont le début est d'apparence variable, s'y acheminent et s'y achèvent très généralement, dans un délai plus ou moins long.

Et, bien que toutes les espèces dermatophytiques connues n'aient pas encore produit la forme dite pléomorphique, ce qui pourrait être mis sur le compte du milieu utilisé, il n'en apparaît pas moins que cette forme duveteuse se présente comme l'aboutissant normal de nos cultures.

Cependant les dermatologistes lui assignent un tout autre caractère et ils l'envisagent comme une régression du végétal. Cette hypothèse s'appuie sur deux ordres de faits. Le premier et le plus important est la non-r versibilité de la forme secondaire à la culture de naissance. On peut trouver singulier qu'un végétal dégénéré ne puisse plus offrir son aspect de jeunesse, quel que soit le nombre de milieux neufs qu'on lui présente. Par contre, on doit admettre que la cause du phénomène n'est pas imputable au milieu, mais bien qu'elle gît dans le parasite lui-même. Cela n'implique pas fatalement une régression, car l'hypothèse suivante, par exemple, expliquerait l'apparition pléomorphique : la formation, dans la première période végétative, d'organes incapables de reproduire le développement mycosique antérieur à ces organes.

Le deuxième fait invoqué par les dermatologistes et moins constant que le premier, est la tendance de la forme secondaire à se dégarnir de plus en plus des organes primitifs de différenciation. Nous montrerons ici qu'on peut faire de grandes réserves sur la signification de la plupart de ces organes, que

la forme pléomorphique est loin d'être l'indice d'un mouvement dégénératif et que, si les dermatophytes s'arrêtent à cette période de leur végétation, c'est que leurs cultures ne sont pas placées dans des conditions convenables d'espace et de temps.

Sur les organes différenciés des Dermatophytes.

Spores. — Les spores, associées en grappes simples ou composées, ont été le premier organe signalé. Elles existent dans toute la série dermatophytique et elles se prolongent dans la forme culturale secondaire.

Tout d'abord, Bouchard avait cru que les Trichophyton présentent leur vie végétative dans l'épiderme, sous l'aspect de filaments rayonnés et qu'ils se reproduisent dans le cheveu au moyen des éléments arrondis, agminés en chapelets, qui constituent d'ailleurs la caractéristique du genre. C'est Duclaux (1886) et Verujsky (1887) qui aperçoivent, les premiers, les hyphes garnies de spores, dans les cultures en milieu artificiel. Depuis cette époque, l'interprétation de la valeur de ces organes n'a pas subi de modifications dans le langage dermatologique; et les expressions de conidies ou de chlamydospores, survenues plus tard, ont laissé la question entière.

En 1899, Matruchot et Dassonville, étudiant le développement du *Tr. equinum*, attribuent à l'hyphe sporifère un degré très marqué de différenciation et donnent aux éléments sporulaires la valeur d'une forme reproductrice normale. Ces auteurs font même un rapprochement étroit entre ces organes et les formes secondaires de reproduction chez les champignons du genre Ctenomyces, à la suite duquel la filiation des parasites des Teignes aux Gymnoascées leur paraît devoir s'imposer.

Sabouraud (1910), à propos de l'étude mycologique du *Tr. crateriforme*, observe que « si les spores externes semblent bien jouer dans ce mode de fructification inférieure un rôle de graine, néanmoins l'appareil sporifère manque de régularité. Quand on examine, après ces préparations, d'autres montrant le même organe du *Botrytis Bassiana*, par exemple, les appareils sporifères de celui-ci apparaissent beaucoup mieux différenciés et plus constants en leur forme que ceux du Tri-

chophyton qu'on leur compare ». Il semble qu'un léger doute subsiste dans l'esprit de l'auteur sur la nature réelle de ces éléments.

Nous ferons, à notre tour, les remarques suivantes.

D'après les dessins qui en ont été publiés et d'après nos observations, les spores des grappes simples ne sont pas insérées latéralement sur l'hyphe, comme on l'écrit d'habitude; ces éléments sont disposés tout autour du mycélium, sur une ligne spirale plus ou moins régulière, à la façon des feuilles d'un grand nombre de végétaux supérieurs. — Les spores, de longueur variable, ont généralement une largeur égale à l'épaisseur de l'hyphe dont elles dérivent. — Chez certaines espèces, comme *Tr. effractum*, *Tr. umbilicatum*, *Tr. plicatile*, *M. Audouïni*, *M. tardum*, *M. equinum*, *M. simplex* (1), les spores deviennent assez souvent filamenteuses et donnent plutôt à l'hyphe l'apparence d'une branche mycélienne qui commencerait à se ramifier.

Bien que, sur milieux gélosés de même qu'en goutte suspendue, ces organes se reproduisent invariablement, nous ne pouvons nous empêcher de signaler le fait suivant. Les cultures microsporiques et trichophytiques, observées dans les conditions dont il est parlé plus loin, ne nous ont jamais donné d'organes analogues; si, au contraire, nous plaçons dans ces mêmes conditions des spores d'*Aspergillus* évolué spontanément dans un tube de gélose, nous constatons, après plusieurs semaines de végétation mycélienne, la formation, à l'extrémité des filaments, des chapelets de spores caractéristiques. Nous estimons donc que la question de la spore, chez les Dermatophytes, appelle des recherches complémentaires.

Organes pectinés. — Présentes chez les Microsporon et quelques Achorion, les hyphes pectinées établiraient un rapprochement très net avec un groupe de champignons supérieurs des plus dégradés parmi les Périsporiacées On les observe, d'après Matruchot et Dassonville, normalement chez les Ctenomyces, où « elles se présentent, soit simples, soit avec denticules d'un seul côté, soit ramifiées comme si quelques-uns des den-

(1) Nous avons fait connaître cette espèce à la Société centrale de Médecine vétérinaire dans la séance du 5 juin 1913.

ticules s'étaient allongés végétativement »; en outre, chez les Ctenomyces, elles ne sont jamais sporifères. Or, nous avons constaté dans les cultures de l'*Achorion Serisei*, observées comme il sera dit plus loin, que ces denticulations dessinent d'abord des hyphes pectinées remarquables, mais qu'elles s'allongent plus tard en simples hyphes et, qu'en conséquence, il est difficile de leur reconnaître une valeur spéciale quelconque.

Fuseaux. — Les fuseaux existent avec une abondance variable dans les diverses espèces de cultures dermatophytiques. Vus d'abord par Neebe et Furthmann (1891), ils ont été retrouvés par Sabouraud (1894) et par Fox et Blaxall (1896).

A leur sujet, Matruchot et Dassonville écrivent en 1899 : « Ces organes énigmatiques, considérés par les dermatologistes comme ayant une valeur morphologique supérieure à celle des conidies, sont pour nous des chlamydospores de même nature et de même origine que les chlamydospores latérales dites conidies. On trouve, en effet, tous les intermédiaires entre les conidies et les fuseaux ». En 1910, Sabouraud, après avoir dit que, chez les Microsporon notamment, les fuseaux présentent un haut degré de signification, se demande si Matruchot et Dassonville ont eu l'occasion d'observer des Microsporon animaux, qui présentent des fuseaux en quantité considérable et dont plusieurs espèces étaient connues au moment où ces auteurs écrivaient. Depuis, l'*A. gypseum* et l'*A. Serisei* ont été décrits et, chez ces espèces tout au moins, il paraît difficile, conformément à l'opinion de Sabouraud, de ne pas accorder au fuseau un caractère certain de différenciation.

Quelle est la fonction de cet organe? A notre connaissance, Bodin seul a donné quelques renseignements à ce sujet. Dans la description de son *A. gypseum*, Bodin dit expressément : « ... pour les conidies pluriseptées il peut y avoir plusieurs boyaux (mycéliens), chacune des loges de ces conidies étant capable de germer simultanément ». A l'appui de cette assertion, l'auteur figure trois fuseaux de chacun desquels émergent une ou deux hyphes de nouvelle formation. Chose curieuse, dans son dernier ouvrage, Sabouraud ne mentionne nulle part cette particularité intéressante. Nous verrons plus loin que les

faits signalés par Bodin ont une importance qu'on ne peut plus négliger.

Spirales et pelotons mycéliens. — Nous ne dirons actuellement que peu de chose des autres organes signalés dans les cultures, tels que les spirales ou vrilles, qui ne paraissent être que des hyphes sous une forme spéciale, tels aussi que les organes nodulaires et les pelotons mycéliens. La vraie signification de ces éléments ne pourra sans doute être établie que lorsque nous connaîtrons le cycle évolutif complet des végétaux producteurs de Teignes.

Les observations qui précèdent nous conduisent à penser que, hormis les fuseaux, nous ne trouvons nulle part d'organes dont la signification soit nettement établie. Cette conclusion énoncée, il devient évident que la technique mycologique actuelle est insuffisante pour obtenir des renseignements botaniques valables.

Rappelons donc en quoi consiste cette technique et cherchons à formuler ses desiderata.

Technique actuelle et technique nécessaire.

La méthode qui consiste à examiner une culture dermatophytique par l'inspection directe ne peut donner d'indications que sur des fragments du parasite, et l'examen est d'autant plus net que la parcelle prélevée est plus petite. Ceci indique qu'il est très malaisé de constater les rapports des diverses parties.

La méthode de la goutte suspendue en cellule est, sans conteste, de beaucoup préférable, mais elle réclame un ensemble d'opérations qui sont assez délicates et assez minutieuses pour arriver à rebuter les observateurs les plus patients. De plus, la manière dont la cellule est confectionnée oblige à suivre le développement cultural par le dessous, condition défectueuse pour cet examen. Enfin, quand la végétation est estimée suffisamment avancée (de quelques jours à trois semaines), les dernières opérations (dessiccation à l'étuve, action des réactifs et des lavages), aplatissent sur la lame les diverses parties du végétal obtenu.

Si l'on ajoute à ces raisons la valeur toute relative que nous attribuons aux organes ainsi observés, nous aurons suffisam-

ment montré le besoin qui se fait sentir d'une technique différente.

Il nous a paru que le développement végétatif serait plus normal en renversant le système cellulaire de la goutte et en donnant au parasite tout le temps nécessaire à son évolution. La réalisation du premier point devait permettre l'examen par le dessus. Quant à la question de temps, nous savons qu'un assez grand nombre de champignons, parasites des végétaux et actuellement bien connus, réclament, dans la nature, des mois entiers pour parcourir leur cycle intégral. Il était donc possible qu'en arrêtant une culture en goutte suspendue au bout de quelques jours ou de quelques semaines, l'opération fût prématurée.

Peut-on laisser en cellule une culture de Teigne pendant un temps plus considérable que celui qui lui est habituellement réservé? On peut répondre positivement à cette question, si l'on remarque que les Dermatophytes, étant dépourvus de chlorophylle, empruntent tous leurs éléments, le carbone y compris, au milieu mis à leur disposition. Quant au faible volume d'air qui leur est dispensé, il doit pouvoir suffire pendant un temps assez long, ces parasites végétant abondamment au sein du bouillon nutritif.

C'est à la suite de ces considérations que nous avons été conduit à employer la méthode de la cellule directe. Sur une lame à concavité centrale, une goutte de bouillon glucosé Sabouraud est déposée et une petite parcelle de la culture à étudier, portée au centre de la goutte. On recouvre d'une lamelle de dimensions plus grandes que celles de la concavité et on lute à la paraffine. Disons tout de suite que ce procédé, d'ailleurs déjà connu, qui nous a donné nos premiers résultats, doit être amélioré, notamment par l'augmentation de la hauteur de la cellule et par la possibilité, sans destruction du système, de redonner au parasite, s'il en est besoin, de nouveaux éléments nutritifs quand la première goutte a été utilisée en entier.

Pour se mettre à peu près sûrement à l'abri de la contamination qui se produirait fatalement en opérant à découvert, nous avons confectionné une boîte à parois de verre dont les faces supérieure et inférieure ont les dimensions des plaques photographiques 13 × 18 et sont séparées par une hauteur de

5 centimètres environ. Des quatre faces latérales ainsi déterminées, l'antérieure et celle de droite sont mobiles dans leur plan et, comme elles peuvent ainsi glisser aisément, la disposition permet de flamber l'intérieur du système et se prête aux diverses manipulations requises. Les opérations sont ainsi rapides et faciles.

PREMIERS RÉSULTATS OBTENUS

a) *Achorion Serisei.*

Nous avons fait connaître récemment (1) un Achorion relevé à Madagascar, sur le cheval, par M. le vétérinaire Sérisé. Ce parasite, qui présente des ressemblances avec l'*A. gypseum* de Bodin, offre, comme ce dernier et comme les Microsporon animaux, des fuseaux très nombreux dont nous avons pu suivre le développement.

Cultivé sur les milieux d'épreuve gélosés, cet Achorion naît sous forme d'une tache blanchâtre qui s'agrandit assez vite et dont le centre prend rapidement une teinte café au lait; il existe une marge périphérique étroite qui conserve la couleur du début. Déjà, par l'examen direct, on peut se rendre compte que le pourtour est composé d'hyphes de diamètre à peu près régulier, garnies de fuseaux à diverses phases de leur développement. Au fur et à mesure que ces fuseaux augmentent de dimensions, ils prennent la teinte de la zone culturale centrale; celle-ci doit en effet sa couleur et son aspect plâtreux à la présence de ces organes qui la constituent à peu près en entier.

Quand les fuseaux naissent sur les hyphes, ils donnent à celles-ci l'apparence de ce qui est désigné communément sous le nom d'hyphes sporifères ou de grappes simples. Et le phénomène évolutif est représenté par la figure 1 (en *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f*, *g*).

Dans les tubes d'isolement placés à 20-25 degrés, on constate d'autre part que le poil ensemencé a déjà donné des fuseaux au bout de trente-six heures. On peut voir que chacun des éléments parasitaires de ce poil s'allonge en un filament

(1) *Bulletin de la Société de Pathologie exotique*, mai 1913.

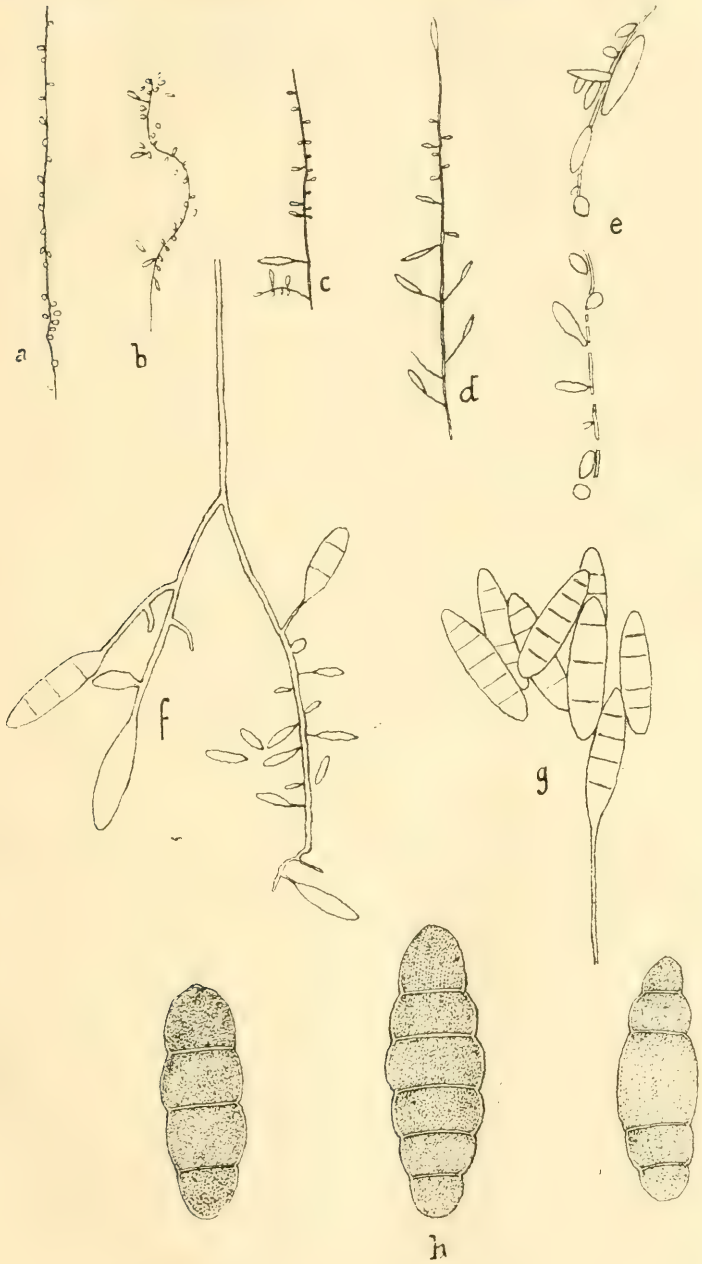


FIG. 1.

mycélien qui aboutit à la formation d'un fuseau terminal. De ce fuseau ne tardent pas à sortir des hyphes fusifères qui se développent à leur tour et qui, par le même processus, finissent par envahir toute la surface du milieu gélosé.

Le fuseau apparaît donc comme un organe de propagation en surface, d'importance capitale.

Prélevé pour l'examen direct dans la zone culturale plâtreuse, le fuseau adulte présente une longueur de 60 μ et une largeur de 12 μ, pouvant aller à 15 μ. Il est divisé en six loges par cinq cloisons; le nombre des septa n'est souvent que de quatre ou de trois; mais, dans ces deux cas, comme les dimensions de l'organe sont généralement inférieures à celles qu'il offre dans le premier, il est possible que le développement de ces fuseaux ne soit pas complet, le nombre infini de ces organes étant certainement une entrave à l'évolution normale de la plupart d'entre eux. Les loges sont formées d'un protoplasma granuleux; les septa qui les limitent sont d'une teinte plus claire qui fait penser autant à un vide de rétraction qu'à la présence d'une cloison vraie. Au niveau de ces cloisons, le fuseau est légèrement étranglé; sa surface porte fréquemment des grains disséminés sans ordre apparent et de la même couleur générale café au lait que l'organe fuselé (fig. 1, *h*).

Quand on place en cellule directe un certain nombre de ces fuseaux (à 20-25 degrés), on en constate d'habitude la multiplication rapide. La figure 2 montre en *i* un fuseau à cinq loges qui, au bout de vingt-quatre heures, a donné non seulement un filament mycélien à chacune de ses extrémités, mais encore neuf hyphes semblables qui naissent sur la surface, en des points ne paraissant avoir aucun rapport avec les loges de l'organe. En *k*, est un fuseau après quatre jours de cellule; il a poussé surtout une hyphe allongée en spirale irrégulière et deux jeunes filaments. En *j*, on voit un fuseau de même époque qui a produit un certain nombre de branches plus ou moins ramifiées. En *l*, enfin sont représentés deux organes fuselés, au cinquième jour, sur les ramifications latérales desquels existent déjà des fuseaux de nouvelle formation. Ces phénomènes se produisent dans la partie inférieure de la goutte de bouillon ensemencée.

En même temps, dans la partie supérieure, se multiplient en

grand nombre les hyphes fusifères représentées par la figure 1.

L'apparition du duvet sur les milieux gélosés est assez

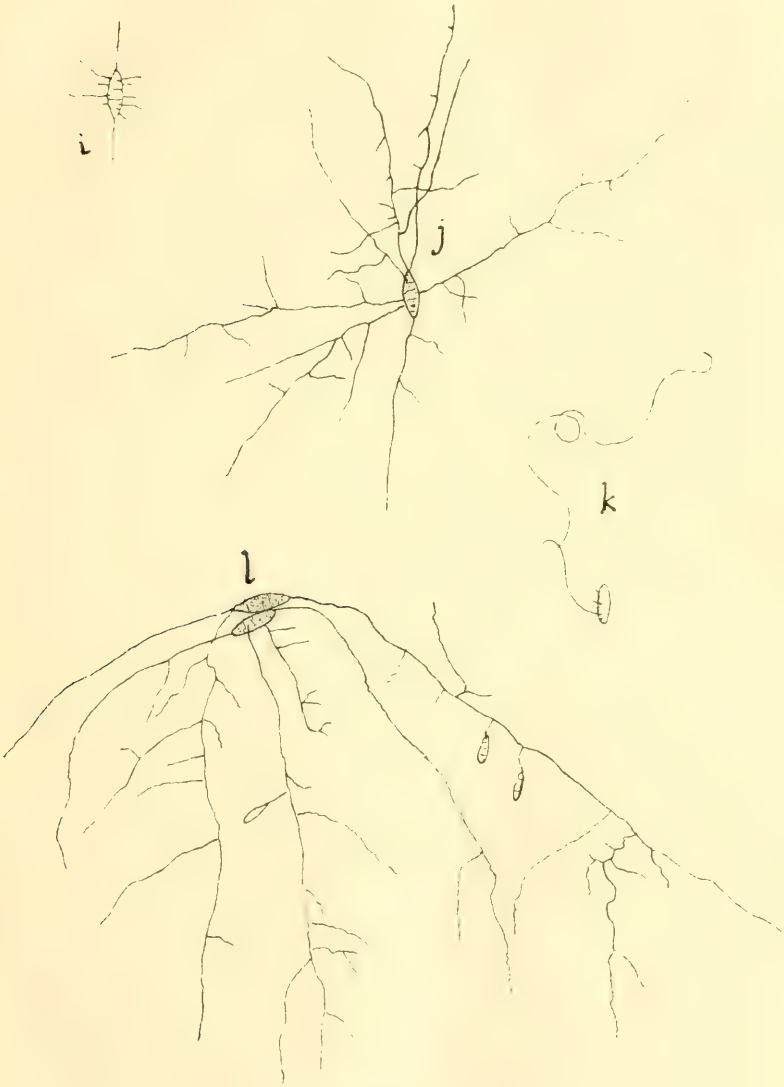


Fig. 2.

inconstante dans l'*Achorion Serisei*. Quand elle se manifeste, on voit naître, le plus souvent au centre, des tiges dressées,

blanches et très délicates, peu denses, qui paraissent s'être glissées au travers de la masse de fuseaux, des parties profondes de la culture. Il est assez fréquent de voir ce duvet se répandre sur toute la surface, en devenant plus serré.

Quand on ensemence ce duvet sur milieu gélosé et en tubes, il ne tarde guère à se propager sur les parois de verre, ainsi que la chose est courante avec les cultures pléomorphiques. Si l'on examine au microscope ce duvet à travers les parois du tube, on le voit formé de branches mycéliennes plus ou moins ramifiées, tout à fait semblables à celles produites, dans la cellule directe, par les fuseaux du plan inférieur. De plus, quand on pratique l'examen direct, entre lame et lamelle, d'un fragment duveteux, il est rare de ne pas constater, au milieu du mycélium, des fuseaux en plus ou moins grand nombre. Et, en repiquant cette forme secondaire tous les dix jours, par exemple, nous avons constaté, au dixième passage, la présence des fuseaux!

Chose encore plus intéressante. Une parcelle de culture duveteuse de l'un quelconque de ces passages en tube de gélose, placée en cellule directe, montre les mêmes détails de développement que lorsqu'on s'adresse aux fuseaux adultes de la culture plâtreuse, à savoir : formation d'hyphes fusifères en haut, production de mycélium ramifié en bas.

Nous pouvons donc nous expliquer aisément l'apparition du duvet, chez l'*A. Serisei*, en milieu gélosé. En même temps que la végétation se propage en surface par la multiplication des hyphes fusifères, productrices de la couche plâtreuse, il se forme, au contact du milieu, des fuseaux qui produisent du mycélium. C'est ce mycélium qui arrive à se glisser parmi les éléments de la couche supérieure et qui constitue le duvet dit pléomorphique. On voit également, par ce fait, pourquoi le pléomorphisme, qui se comporte en cellule directe comme dans la culture primaire, ne peut être l'indice d'une régression. Il se constitue, dès le début, sous la couche plâtreuse.

Quand on laisse la cellule directe abandonnée à elle-même, on observe d'autres faits dignes également d'être mentionnés. Il arrive assez vite que le développement des fuseaux supérieurs s'arrête; par contre, les branches mycéliennes des parties profondes continuent à végéter. Fréquemment, ces bran-

ches forment des dessins pectinés aussi nettement accusés que ceux de l'*Achorion Schönleinii*; des hyphes latérales se forment, le plus souvent d'un seul côté des rameaux; elles restent pendant plusieurs semaines en l'état, puis ces denticulations s'allongent, mais elles s'infléchissent dans l'espace limité par le rameau voisin, en restant sensiblement parallèles.

D'une manière générale, le mycélium se répand sur le plancher de la cellule; au microscope il paraît hyalin; sa membrane d'enveloppe est légèrement indiquée et il s'anastomose souvent avec les filaments voisins.

Au bout de plusieurs semaines, on voit apparaître des rameaux aériens dont la paroi, plus dessinée, est brunâtre; cela tient sans doute à ce que ces formations sont observées dans l'air et n'ont aucun contact avec le verre, car elles redeviennent hyalines dès qu'elles atteignent la face inférieure de la lamelle sur laquelle elles courent. Après un mois de culture on commence d'apercevoir à la périphérie un certain nombre de ces rameaux, porteurs de nouveaux organes, représentés par la figure 3.

Ces organes sont à peu près sphériques et disposés en chapelets sur des rameaux latéraux d'épaisseur moindre. Ils offrent des dispositions variées, dans les conditions, peut-être encore insuffisantes, de nos observations. Ils sont tantôt en petit nombre à l'extrémité du stérigmate; parfois, une courte portion de ce dernier sépare deux éléments voisins; tantôt la chaîne paraît sessile, ce qui peut être dû à sa direction oblique par rapport à la direction du rameau central. Vus à 1.000 D., ces éléments sont sphériques ou légèrement allongés et, dans ce cas, de $4\ \mu \times 3\mu$; ils ne sont pas exactement tangents, mais séparés par un disque plus ou moins épais. Ces formations se développent aussi sur le mycélium rampant.

Quelle est la valeur botanique de ces productions? Il semble que la réponse à cette question ne pourra être donnée que lorsque nous connaîtrons en entier le développement de l'*A. Serisei*. A ce moment seulement, il sera légitime d'attribuer à chaque organe son rôle physiologique et, en même temps, de déterminer et de classer l'espèce.

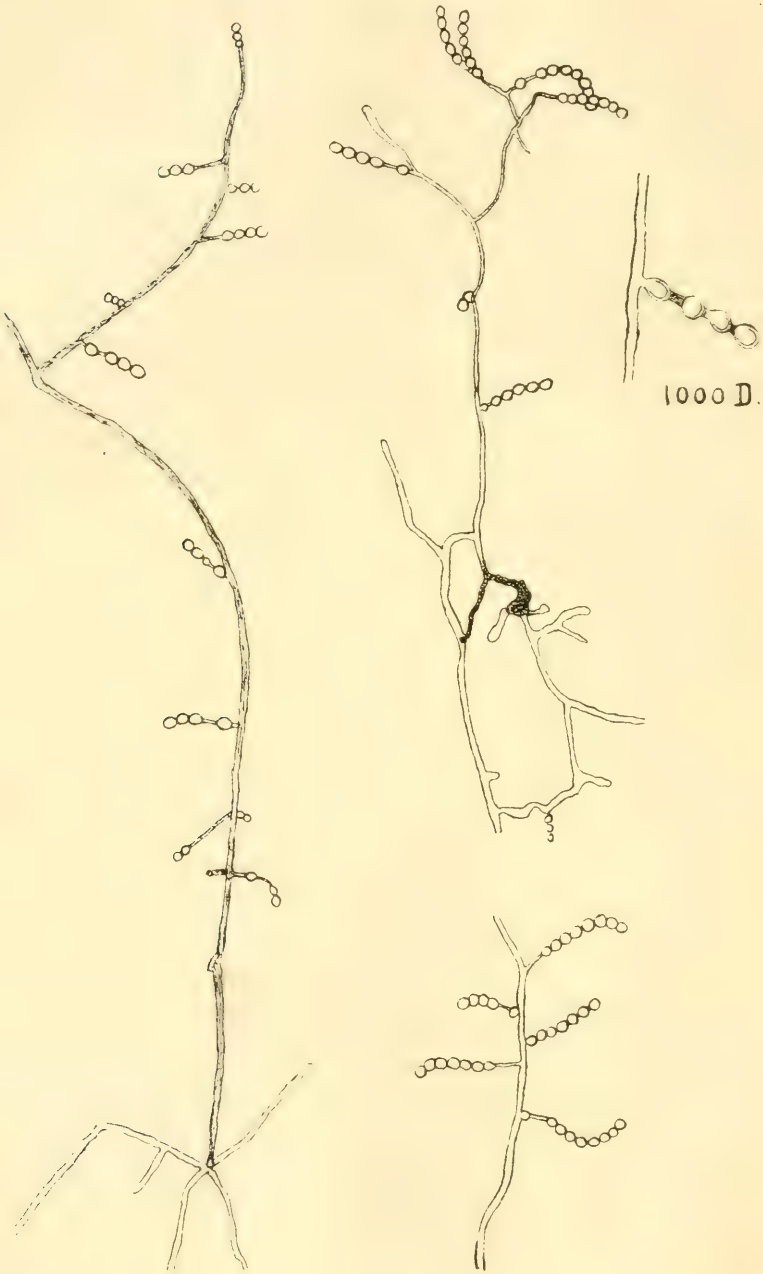


Fig. 3.

b) *Microsporon equinum.*

D'après la description des cultures du *M. equinum* donnée par Bodin et d'après nos observations, le champignon présente, en dehors de ses hyphes normales, c'est-à-dire de diamètre régulier, des filaments pourvus de renflements divers qui lui donnent l'apparence de mycélium en raquette ou bien moniliforme. Ce parasite est pourvu, sur les mêmes milieux gélosés, d'organes pectinés assez rares, de grappes simples et de fuseaux uni-ou pluriloculaires, souvent échinulés.

Il était intéressant d'observer ce que deviendraient ces divers organes en cellule directe.

Nous savions déjà que le *M. equinum*, ainsi que d'autres champignons du même genre, cultivé en ballons, dans du bouillon maltosé ou glucosé, ne donne que des filaments de diamètre régulier et que, par conséquent, la plus grande partie des organes signalés ci-dessus disparaissent. Cette particularité nous avait même fait soupçonner la présence de la gélose, dans les milieux d'épreuve, d'apporter une certaine gêne dans l'évolution normale du parasite et d'être ainsi la cause de la formation, dans les cultures, de ces organes de différenciation qu'on s'attache à décrire en dermatologie.

Quoi qu'il en soit de cette hypothèse, le *M. equinum*, placé en cellule directe, ne montre ni grappes, ni chlamydospores, ni filaments pectinés. De tous les organes signalés, le fuseau seul persiste, et c'est surtout grâce à lui que la végétation se poursuit et s'étend. La figure 4 reproduit la partie centrale de la culture fournie par un fuseau. On peut y voir que ce sont surtout les extrémités de l'organe qui donnent les branches du mycélium primitives, lesquelles ne tardent pas à se multiplier en tous sens.

Comme nous l'avons indiqué à propos de l'*A. Serisei*, le développement mycélien s'opère d'abord sur le fond de la cellule, par la formation intercurrente de nouveaux fuseaux. Au bout de deux mois environ, et alors que le bouillon paraît avoir été utilisé en totalité, apparaissent des rameaux aériens portant des chapelets semblables à ceux de l'*A. Serisei* et garnis d'éléments plus petits et moins nombreux (fig. V, *m*). Ces nou-

veaux organes se forment aussi sur le mycélium rampant. Il devient, dès lors, très vraisemblable que le duvet pléomor-

Fig. 4.

phique chez le *M. equinum* est fonction du fuseau et que cette espèce possède une affinité botanique marquée avec l'*A. Serisei*.

c) *Achorion* Sp. (?).

Dans une espèce d'Achorion d'origine malgache et dont l'étude n'est point achevée, nous avons obtenu, par la même méthode, des conidiophores insérés à la surface de productions sclérotiques sphériques comme cela se voit, par exemple, chez une Hémobasidée, le *Polyporus annosus*. Nous ne tirerons de cette ressemblance aucun argument prématuré sur la position de ce parasite. (fig. 5, *n*.).

d) *Trichophyton equinum*.

Matruchot et Dassonville, qui ont fait connaître ce champignon, producteur fréquent de Teignes régimentaires, reconnaissent dans ses cultures sur milieux gélosés : des rameaux sporifères naissant à angle droit sur le mycélium, des spores solitaires ovales, comme tronquées à la base, naissant latéralement et irrégulièrement sur les filaments rampants, des enkystements intercalaires donnant naissance à des chlamydospores, des phénomènes d'émigration du protoplasme dans les spores.

Or, si nous plaçons en cellule directe une parcelle de culture trichophytique, nous ne voyons plus se former ces diverses particularités organiques. Mais les hyphes se multiplient, se ramifient, s'anastomosent et finissent par constituer un stroma à mailles plus ou moins serrées ; des cordonnets, qui en émergent pour devenir aériens, aboutissent à la formation de sclérotes dont la fig. 5, en *r*, peut donner une idée.

Tels sont les divers résultats obtenus après quelques mois d'observation en cellule directe.

Conclusions.

Nous avons déjà fait remarquer qu'il est impossible de considérer comme complets les renseignements nouveaux apportés. Ces notions sont encore insuffisantes pour assurer la détermination botanique des Dermatophytes.

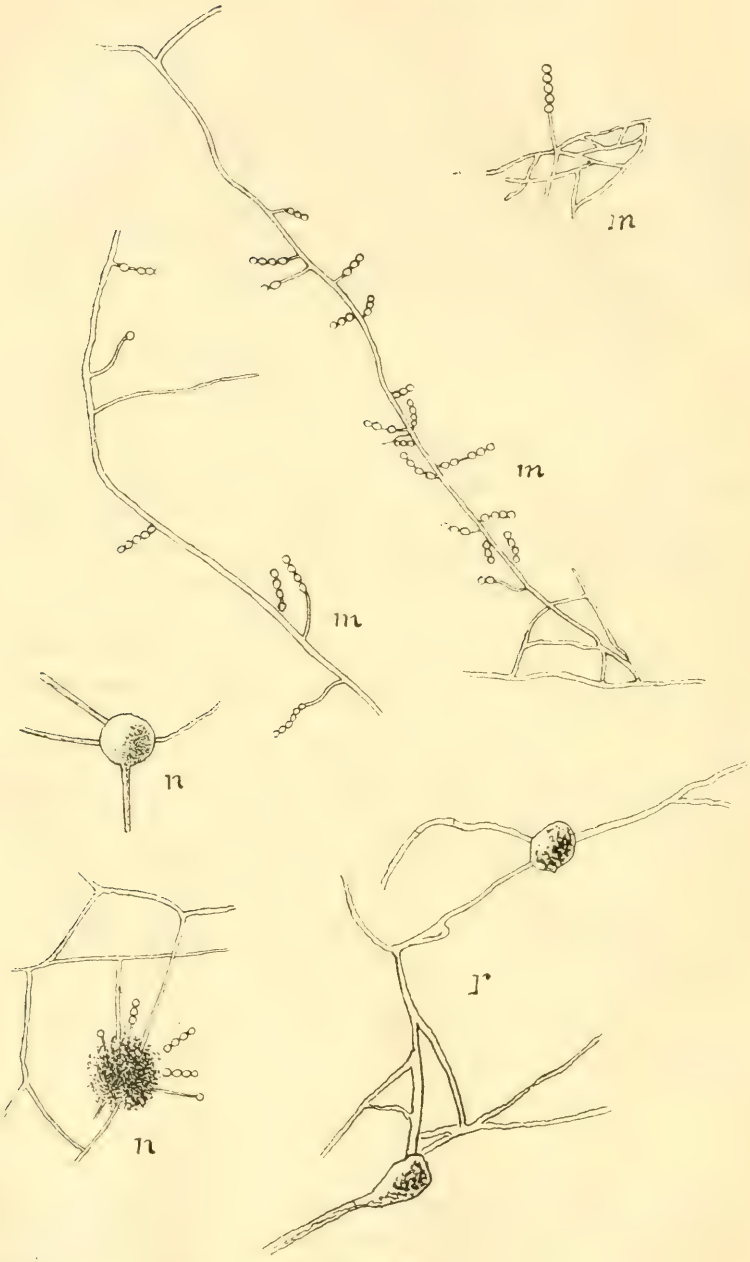


Fig. 5.

Cependant, nous avons cru intéressant de les faire connaître pour orienter les recherches vers une voie nouvelle, et nous formulerons les premières conclusions suivantes :

1° Dans les cultures dermatophytiques en milieux gélosés, les parasites ont une tendance normale à s'achever en duvet;

2° Si, au point de vue dermatologique, l'expression de pléomorphisme, qui ne renferme pas d'indication sur la nature du phénomène, peut sans inconvénient être admise, le mycologue ne doit voir dans le duvet ainsi nommé que l'expression d'un mycélium entravé dans son évolution ;

3° Les cultures réalisées jusqu'à ce jour en milieux d'épreuve gélosés, ne donnent pas d'organes valables pour la classification (le fuseau étant mis à part);

4° Le problème de la position systématique des agents parasitaires des Teignes ne peut être résolu qu'en donnant aux cultures l'espace et le temps nécessaires.

Ce dernier principe admis, il convient de rechercher la meilleure technique pour aboutir. A cette œuvre, nous convions les dermatologistes et les mycologues.

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

28e ANNÉE FÉVRIER 1914 N° 2

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDES SUR LA FLORE INTESTINALE

(QUATRIÈME MÉMOIRE)

LES DIARRHÉES DES NOURRISSONS

par Él. METCHNIKOFF.

(Avec les planches V, VI, VII, VIII.)

I

LA NATURE DU CHOLÉRA INFANTILE

RÉSUMÉ DES OPINIONS DES CLINICIENS.
PREUVES EXPÉRIMENTALES DE LA NATURE INFECTIEUSE
DU CHOLÉRA DES NOURRISSONS

Parmi les problèmes qui ont provoqué des batailles entre l'ancienne et la nouvelle médecine, l'un des plus importants, celui de la diarrhée des nourrissons, est aussi l'un des moins éclaircis. Il semble échapper aux prises de la microbiologie et résister comme une dernière redoute où s'est réfugié l'esprit qui régnait avant l'époque pastorienne. Après une période où l'on a pensé résoudre le problème par la méthode qui a donné de si brillants résultats dans l'étude du choléra asiatique, on s'est rejeté dans la clinique pure, et c'est elle qui fait la loi dans la pédiatrie actuelle. Il suffit de jeter un coup d'œil sur les traités les plus récents pour s'en assurer.

Ce sont les pédiâtres allemands qui ont donné le mot d'ordre dans cette question. Ils pensent que la bactériologie a fait faillite dans la recherche étiologique des diarrhées infantiles et que ce

n'est pas dans la voie des maladies infectieuses qu'il faut chercher la solution du problème. Le médecin d'enfants bien connu, Finkelstein (1), résume de la façon suivante l'opinion devenue courante parmi ses confrères. Il n'y aurait que très peu de diarrhées des nourrissons qui auraient pour cause quelque influence microbienne. La majorité des cas de cette maladie « présentent des accidents de fièvre et d'intoxication, devant lesquels le bactériologiste, de même que l'anatomo-pathologiste, restent impuissants à expliquer la maladie et la mort. L'absence de toute lésion des tissus, ainsi que des bactéries particulières, ne permet pas de rattacher le mal à quelque état inflammatoire des intestins » (p. 260).

En cet état de choses, l'explication de la cause des intoxications « doit être cherchée dans une autre voie que celle de l'empoisonnement bactérien » (p. 262). « La supposition que la fièvre alimentaire et sa conséquence — l'intoxication — surviennent à la suite d'un trouble général des échanges nutritifs intermédiaires, a été pendant ces dernières années démontrée comme un fait réel » (p. 263).

Etant donné que ce trouble se manifeste surtout pendant la saison chaude, on a admis que la chaleur constitue la cause primaire et la plus essentielle des diarrhées des nourrissons. On a même exprimé l'avis que cette maladie est un « coup de chaleur » (*Hitzschlag*) comparable à celui auquel sont sujettes les personnes adultes pendant les fortes chaleurs. Ritschel (2), qui est un des initiateurs de cette théorie, se défend d'identifier le choléra des nourrissons avec le coup de chaleur, mais il affirme tout de même que « l'action de la chaleur est le facteur principal » dans cette maladie des enfants. Pour lui, « la diarrhée est intimement liée avec le mal causé par la chaleur et peut bien être interprétée comme la conséquence de cette dernière » (p. 340).

L'idée que la plupart des diarrhées infantiles ne sont pas de nature infectieuse a trouvé bon accueil parmi les pédiatres d'autres pays. Ainsi Combe, dans un traité tout récent sur « les maladies gastro-intestinales aiguës des nourrissons (3) », va

(1) *Lehrbuch der Säuglingskrankheiten*, II, Berlin, 1911.
(2) *Jahrbuch für Kinderheilkunde*, 1er septembre 1913, p. 312.
(3) Paris, 1913, Baillière et fils, édit.

jusqu'à dire que « la plus minime partie » seulement de ces affections peut être attribuée aux microbes. « Les autres, et voilà sur quoi il faut insister dans notre enseignement, les principales parmi les maladies gastro-intestinales du nourrisson, ne sont en effet *pas d'origine infectieuse*. Elles sont causées *par l'alimentation et les méthodes alimentaires*; elles n'ont rien à voir avec les microbes, qui n'agissent dans ces cas que secondairement (p. 5). »

Nous trouvons la défense de la même théorie dans le *Précis* de Nobécourt (1). « Les états bactériens des fèces » — affirme-t-il — « sont *la conséquence* des facteurs précédents (fonctionnement défectueux des intestins, etc.); rien ne permet de les considérer comme le *primum movens* des troubles digestifs. » « Les microbes ne sont pas les agents nécessaires de toutes les affections gastro-intestinales, même graves (p. 136). »

Ce qui est particulièrement étonnant, c'est que ces idées, qui sont en flagrante contradiction avec les principes si féconds de la médecine pastorienne, ont pu être acceptées même par quelques microbiologistes. C'est ainsi que Mazé (2) affirme que « la diarrhée infantile » « n'affecte pas l'allure d'une maladie contagieuse ».

La théorie que les microbes ne jouent pas le rôle prépondérant dans les diarrhées des nourrissons a pour base le fait bien établi que cette maladie n'épargne même pas les enfants nourris avec du lait parfaitement stérile. Or, depuis longtemps, on est fermement persuadé qu'il n'y a que le lait qui soit capable d'apporter aux nourrissons la source de contagion. Cette idée est cependant erronée, de même que cette autre, que le choléra (ou gastro-entérite) des nourrissons n'est pas une maladie infectieuse.

De même que dans la fièvre typhoïde (que l'on attribua pendant longtemps exclusivement à la contamination de l'eau de boisson), un grand rôle est joué par les « porteurs de bacilles », capables d'apporter le virus, de même dans les diarrhées des nourrissons les enfants peuvent être infectés par d'autres facteurs que le lait, notamment par les porteurs de germes morbides.

(1) *Précis de médecine infantile*, 2e édition. Paris, 1912, Masson et Cie, édit.
(2) *Revue scientifique*, 23 août 1913, p. 240.

Il y a déjà quatre ans que j'ai apporté dans une communication à l'Académie de Médecine (1) la preuve que la gastro-entérite estivale des nourrissons est une maladie infectieuse, capable de se transmettre aux chimpanzés et aux lapins à la mamelle. J'y ai rapporté l'histoire de trois chimpanzés ayant pris cette maladie à la suite d'ingestion de matières fécales. Deux de ces anthropoïdes (nos I et II) avalèrent un peu de matières fécales d'une fillette atteinte de « gastro-entérite aiguë », d'après le diagnostic du service de la crèche de l'hôpital des Enfants-Malades. Atteinte depuis un mois de diarrhée et de vomissements, cette enfant émettait des matières muqueuses jaune vert, très riches en leucocytes polynucléaires (fig. 1). Chez les deux chimpanzés, auparavant bien portants, la diarrhée se déclara le lendemain après l'absorption par la bouche des matières fécales et continua pendant un mois chez le premier et dix jours chez le second de ces animaux.

Un troisième chimpanzé (n° III), après avoir avalé un peu de matières fécales du premier chimpanzé atteint de diarrhée infantile (n° I), fut pris le lendemain de diarrhée liquide qui dura pendant une semaine.

Bien que ces trois expériences nous fournissent déjà la preuve de la nature infectieuse de la gastro-entérite des nourrissons, nous crûmes utile de les multiplier dans la suite. Aussi, en août 1910, nous fîmes avaler par un jeune chimpanzé (n° IV) un peu de déjections muqueuses vertes d'un garçon de deux mois atteint de gastro-entérite mortelle et, trois jours après, une petite quantité de matières fécales du même enfant, mélangées aux déjections diarrhéiques de deux autres nourrissons malades. Le cinquième jour après la première prise, le chimpanzé fut pris de diarrhée liquide qui dura pendant trois jours.

Après nous être assuré de la santé parfaite d'un jeune chimpanzé (n° V) qui émettait des selles moulées, nous lui avons donné à avaler, le 20 août 1913, un peu de matières très vertes et très fétides d'un nourrisson âgé de un mois, atteint de diarrhée et de vomissements. Le lendemain, les déjections de l'anthropoïde devinrent plus molles et, à partir du quatrième jour de l'expérience, elles présentèrent le caractère franchement

(1) *Bulletin de l'Académie de Médecine*, 1909, p. 326.

diarrhéique. Au cinquième jour, les matières prirent une teinte verdâtre et accusèrent, après un séjour de vingt-quatre heures, une coloration très verte, caractéristique de la diarrhée verte des nourrissons.

La diarrhée du chimpanzé, ayant présenté des rémissions et des exacerbations, a duré pendant deux semaines. Elle avait fini par affecter l'animal au point qu'il refusa de prendre la nourriture et s'affaiblit au plus haut degré. Les derniers jours de sa vie, il n'émit qu'un peu de mucus rectal et mourut vingt-trois jours après le début de l'expérience. A l'autopsie, pratiquée par le Dr Salimbeni, on a pu constater des tubercules disséminés, non caséifiés, dans le lobe moyen du poumon droit. Les lésions principales, ayant causé la mort, se trouvaient dans les intestins; la muqueuse de l'iléon et du gros intestin était congestionnée, et, au niveau du jéjunum, légèrement œdématiée; les plaques de Peyer étaient nettement hypertrophiées et la muqueuse de la dernière partie du gros intestin et du rectum présentait des érosions assez nombreuses. M. Salimbeni trouva une grande ressemblance entre les lésions du chimpanzé et celles que l'on constate chez les nourrissons morts de gastro-entérite.

Dans l'intention d'établir si les anthropoïdes autres que le chimpanzé sont sensibles à la diarrhée des nourrissons, nous avons donné (en décembre 1911) à avaler à un jeune orang-outang un peu de matières fécales provenant de deux nourrissons atteints de diarrhée à la crèche de l'hôpital Trousseau. De même qu'avant le début de l'expérience, les deux premiers jours qui suivirent, les matières fécales de l'animal étaient dures, mais à partir du quatrième jour s'établit une diarrhée liquide qui amena la mort après quatre jours de maladie. A l'autopsie, les poumons et le cœur ont été trouvés intacts, la rate hypertrophiée, le foie gras par endroits. Le siège du mal était localisé dans les intestins. L'estomac contenait un peu de mucus; la muqueuse de l'intestin grêle, légèrement hypérémiée, renfermait un liquide grisâtre; le cæcum et le côlon étaient remplis du même liquide diarrhéique.

Bien que les six expériences que nous venons de relater démontrent la sensibilité des anthropoïdes pour la gastro-entérite des nourrissons, il ne faut pas en conclure que tous ces animaux

sans exception soient susceptibles de prendre la maladie. Ainsi, chez un chimpanzé (n° VI) auquel nous avons administré un peu de matières fécales du même nourrisson qui a servi pour le chimpanzé n° I, une diarrhée passagère ne se déclara que dix jours plus tard. Il est probable que dans cette expérience il ne s'agit pas de gastro-entérite provoquée par l'ingestion des fèces, mais d'une diarrhée due à quelque autre cause.

Nous avons observé enfin un chimpanzé chez lequel l'ingestion de matières fécales diarrhéiques de nourrisson n'a pas provoqué le moindre trouble.

En somme, sur huit anthropoïdes, six ont manifesté des accidents très nets de diarrhée expérimentale. Etant donné que leur nourriture, composée de bananes et de pain blanc, ne se distinguait en rien de leur alimentation normale, ce n'est pas dans le régime qu'il faut chercher la cause de la maladie. On ne peut pas non plus incriminer le rôle direct de la chaleur, d'abord parce que les anthropoïdes sont habitués à supporter des chaleurs beaucoup plus grandes que celles de nos climats, et ensuite parce que nous avons obtenu la diarrhée expérimentale même pendant la saison froide.

Les singes inférieurs, macaques et cynocéphales, se sont montrés réfractaires à la diarrhée des nourrissons. Plusieurs de ces animaux, les plus jeunes que nous ayons pu nous procurer, ont supporté l'ingestion des matières diarrhéiques sans aucune conséquence. Même un petit macaque (*M. cynomolgus*), né dans notre ménagerie, a accusé une grande insensibilité pour ces matières. Deux semaines après sa naissance (le 22 août 1911), nous lui avons administré un peu de selles d'un garçonnet de six mois atteint de diarrhée mortelle. Le lendemain et le surlendemain, nous lui avons donné encore à avaler un peu de matières provenant de six autres nourrissons atteints de gastro-entérite. Le seul résultat que nous ayons pu obtenir a été la coloration verte des matières fécales molles, mais bien moulées, pendant plusieurs jours, à partir de la sixième journée après la première ingestion.

D'assez nombreuses souris, auxquelles nous avons donné à manger des matières fécales diarrhéiques des nourrissons, ne nous ont jamais donné de résultats positifs.

Devant l'impossibilité d'employer les singes inférieurs et les

souris pour l'étude des diarrhées des nourrissons, et en présence des difficultés qu'il y a à se procurer toujours des singes anthropoïdes, encouragé par le succès de nos recherches sur le choléra asiatique, nous nous sommes adressé aux lapins à la mamelle. Dans notre première expérience, six lapins, âgés de cinquante heures environ, avalèrent un peu de déjections diarrhéiques vertes d'un nourrisson de quatre mois, atteint de choléra infantile mortel (en septembre 1909). Cinq jours après, tous les six furent pris de diarrhée liquide à laquelle trois lapins ne tardèrent pas à succomber. Deux autres lapins guérirent quelques jours après, tandis que le dernier continua à avoir la diarrhée encore assez longtemps.

Dans une seconde expérience, dans laquelle huit lapins âgés de trois jours avalèrent le dépôt centrifugé de matières vert brun d'un nourrisson atteint de diarrhée verte (en octobre 1910), un seul fut pris de choléra typique mortel, tandis que les autres restèrent bien portants. La troisième expérience a été faite avec six lapins âgés de onze jours, qui avalèrent d'abord un peu de selle muqueuse, de couleur vert sale, provenant d'un nourrisson atteint de gastro-entérite mortelle. Trois jours après, je leur administrai par la bouche une petite quantité de matières fécales du même nourrisson, ainsi qu'un peu de déjections de deux autres nourrissons atteints de diarrhée. (Les mêmes déjections avaient servi pour un de nos chimpanzés, n° IV). Quatre jours après le début de l'expérience, deux lapins furent pris de diarrhée liquide qui dura plusieurs jours. Un de ces lapins mourut trois jours après le début de la maladie, tandis que le second guérit définitivement. Les quatre autres de la même nichée ne manifestèrent aucun trouble.

Un peu des matières diarrhéiques du même nourrisson, qui avaient servi aux lapins de l'expérience précédente, a été avalé en une seule prise dans une autre expérience par cinq lapins âgés de trois jours. Un de ces animaux mourut prématurément le surlendemain. Mais les quatre restants furent pris de diarrhée liquide, à laquelle ils succombèrent tous dans l'espace de quatre jours.

Dans une autre expérience, trois lapins âgés de cinq jours avalèrent un peu de matières verdâtres d'un nourrisson atteint de diarrhée verte. Un de ces lapins contracta une forte diarrhée,

à laquelle il succomba douze jours après la prise des déjections. Les deux autres lapins demeurèrent bien portants. Mais deux lapins de la même nichée, qui n'avaient pas reçu de matières fécales, manifestèrent une diarrhée mortelle caractéristique pour le choléra des nourrissons. Il faut admettre qu'ils s'étaient infectés en tétant leur mère, dont les mamelles étaient souillées par le contenu infectieux de la bouche des trois premiers lapins. Un phénomène analogue a été souvent observé dans le choléra asiatique expérimental des lapins à la mamelle.

Une sixième expérience, dans laquelle trois lapins âgés de trois jours avalèrent un peu de matières diarrhéiques d'un nourrisson, n'amena pas de suites, et les animaux ont continué à se bien porter. Est-ce la saison trop avancée (l'expérience a été faite en octobre 1910) qui a amené cet échec, ou bien une autre cause quelconque, nous n'avons pu l'établir. Mais il est à signaler que, sur six expériences, cinq nous ont donné un résultat positif (1).

L'analogie du choléra infantile des petits lapins avec le choléra asiatique expérimental de ces animaux (2) est vraiment remarquable. Pendant la vie, les lapins malades excrètent des matières très liquides qui salissent le train de derrière; les uns s'affaiblissent progressivement jusqu'à la mort, tandis que les autres guérissent au bout de quelques jours. La sensibilité individuelle des petits lapins est semblable dans les deux choléras. On observe des nichées dans lesquelles un certain nombre de ces animaux contractent la maladie mortelle, à côté d'autres qui ne manifestent aucun trouble. Des nichées entières réfractaires vis-à-vis des deux choléras se rencontrent quelquefois, ainsi que le démontre, entre autres, notre cinquième expérience sur le choléra infantile.

En général, le choléra infantile des petits lapins est moins grave que le choléra asiatique, car il y a beaucoup plus de cas de guérison dans le premier.

L'autopsie des petits lapins morts à la suite des deux choléras révèle un tableau identique. Le cœur, les poumons, la

(1) Quelques expériences avec le liquide provenant de la filtration des déjections des nourrissons malades ont été faites sur des petits lapins, mais on doit les continuer avant d'en tirer une conclusion définitive.

(2) Ces *Annales*, 1894, p. 557.

rate et le foie ne présentent le plus souvent aucune lésion. L'estomac est presque toujours rempli d'une quantité de lait coagulé, de réaction acide ; l'intestin grêle est plus ou moins congestionné, parfois avec la couleur hortensia typique. Le cæcum, non hyperémié, est rempli de liquide alcalin abondant, transparent ou légèrement trouble, dans lequel nagent de petits grumeaux de couleur jaune ou verdâtre. Le côlon et le rectum contiennent le même liquide que le cæcum, mais en plus petite quantité. La vessie est vide, à quelques exceptions près. A l'examen macroscopique des lapins morts, il est impossible de distinguer le choléra infantile du choléra asiatique.

Dans les conditions que nous venons d'exposer, il ne peut plus y avoir de doute sur la nature infectieuse des diarrhées des nourrissons. Si parfois la nourriture et la température ambiante exercent leur influence sur cette maladie, il en est de même pour le choléra asiatique de l'homme, dont les rapports avec les écarts de régime et la chaleur sont connus de tout le monde, sans que, pour cela, on en nie le caractère purement infectieux.

II

BACTÉRIOLOGIE DU CHOLÉRA INFANTILE DES NOURRISSONS

Un grand nombre de travaux ont été faits sur ce sujet, depuis les premières tentatives d'Escherich et de ses élèves. Encouragés par les résultats si brillants obtenus par Koch dans le choléra asiatique, les chercheurs espéraient trouver dans les diarrhées des nourrissons quelque microbe spécifique, de même que le vibrion cholérique est spécifique pour le choléra asiatique. Ces espérances furent déçues. Dans le contenu intestinal et dans les matières fécales des nourrissons atteints de choléra infantile, on rencontrait toujours en plus ou moins grande quantité les mêmes bactéries qu'à l'état normal, ce qui amena la supposition que la cause de la maladie résidait dans le renforcement de la virulence des microbes banaux ou bien dans une production toxique exagérée.

Nous croyons inutile de citer ici le grand nombre de mémoires publiés sur la question, d'autant plus que le lecteur en trouvera

un aperçu complet dans le travail de Bahr (1) sur l'étiologie du choléra infantile.

La plupart des chercheurs se contentaient de préparer des cultures de microbes intestinaux dans quelques-uns des milieux nutritifs et d'indiquer les plus fréquents. Il en est résulté que les uns incriminaient des streptocoques, d'autres le bacille pyocyanique ou les bacilles acido-résistants (« *blaue Bacillose* » de Escherich) ; quelquefois (comme Booker (2) en 1897) le bacille *Proteus* ou le bacille de Welch (*perfringens*). Mais c'est surtout le colibacille, ce microbe constant de la flore intestinale, que l'on invoquait comme agent du choléra infantile. Tout récemment encore, Bahr et Thomsen (3), à Copenhague, ont soutenu cette thèse, s'appuyant sur leurs recherches nombreuses. Pour Bahr, « les formes du groupe coli-typhique jouent le rôle principal dans la plupart des cas » de choléra des nourrissons (p. 349). Il distingue dans ce groupe plusieurs catégories, définies surtout par le pouvoir de faire fermenter divers sucres. Parmi ces microbes, c'est le bacille *metacoli*, capable de n'attaquer parmi les sucres que le glucose, qui a attiré le plus l'attention de l'auteur. Bien que ses tentatives pour obtenir la diarrhée expérimentale chez les animaux (notamment les souris) ne lui aient pas donné de résultats précis, Bahr s'appuie sur l'analogie du choléra des nourrissons avec la diarrhée des jeunes veaux, dans laquelle Jensen attribue le rôle prépondérant justement aux bacilles du groupe coli.

Dans un autre travail récent, Gildemeister et Baerthlein (4) rapportent le résultat de leurs recherches sur 70 cas de diarrhée estivale des nourrissons à Berlin en 1912. Ils ont été frappés par la fréquence relative de bacilles dysentériques du type *Flexner* qu'ils ont trouvés dans 9 cas. Beaucoup plus fréquents parmi les microbes isolés par eux étaient cependant : une variété du colibacille (*Bacterium coli mutabile*), constatée dans 31 p. 100; le *Proteus*, dans 31 p. 100, et une race de *Bacterium suipestifer* qu'ils désignent sous le nom de « race de Dahlem ».

(1) *Centralbl. f. Bakteriologie*, Abt. I, Originale. Vol. LXVI, 1912, p. 335.
(2) *The John Hopkins Hospital Reports*, vol. VI, 1897.
(3) *Centralbl. f. Bakteriologie.*, vol. LXVI, 1912, p. 365.
(4) *Deutsche medic. Wochensch.*, 1913, p. 982.

Dans mes recherches, commencées en l'été 1909, je me suis guidé d'abord sur la supposition que le choléra des nourrissons pourrait bien être une infection due à l'un des bacilles paratyphiques. Etant donné d'un côté que les pédiatres avaient été dissuadés de l'origine infectieuse de cette maladie par le fait qu'elle n'est point empêchée par la stérilisation du lait, et, de l'autre, qu'un grand nombre de sujets sont porteurs de bacilles paratyphiques capables de contaminer les nourrissons indépendamment du lait, je me suis demandé si ce microbe ne serait pas la cause du mal. Cette supposition trouvait un appui dans la constatation faite souvent que les matières fécales des nourrissons atteints de diarrhée se distinguent par la prédominance des bactéries ne prenant pas le Gram. Malgré toute sa vraisemblance, cette hypothèse n'a pas tardé à être renversée par des faits précis. D'abord la résistance des souris, si sensibles aux paratyphiques, à la diarrhée des nourrissons, se trouvait en contradiction avec elle, et puis, surtout, le fait que les microbes poussant en colonies bleues sur les plaques de *Conradi-Drigalski* étaient rares après l'ensemencement avec des matières diarrhéiques. Dès mes premières recherches, j'ai été frappé par la fréquence du *Proteus* dans ces matières, ce qui m'a amené à penser que ce ne sont pas les bacilles paratyphiques, mais plutôt les *Proteus* qui jouent le rôle prédominant.

Dans le résumé de mes recherches de la première année, je me suis exprimé de la façon suivante : « Il reste encore à élucider plus d'un point important dans l'étude des diarrhées infantiles. Le *Proteus* est-il l'agent important dans toutes les épidémies de cette maladie ? Quels sont les microbes qui favorisent l'action pathogène du *Proteus* » (1) ? Dans l'intention de répondre à ces questions, j'ai continué mes recherches pendant les quatre années suivantes (1910-1913), me servant du matériel fourni surtout par la crèche de l'hôpital des Enfants-Malades, en partie par celle de l'hôpital Trousseau, et aussi par l'hôpital Pasteur. J'adresse mes sincères remerciements au personnel de ces établissements.

(1) *Bulletin de l'Acad. de Méd.*, 1909, p. 332.

J'ai pu étudier en tout 218 cas de diarrhées des nourrissons, répartis de la façon suivante :

36 cas	en 1909
34 cas	en 1910
81 cas	en 1911
47 cas	en 1912
20 cas	en 1913
En tout : 218 cas.	

Les matières fécales, recueillies dans les meilleures conditions possibles (sur des couches stérilisées ou lavées à l'eau bouillante), étaient examinées le jour même (1). Les frottis des matières étaient uniformément colorés par la méthode de Gram avec coloration supplémentaire par le *Ziehl* dilué. Les matières étaient ensemencées simultanément dans plusieurs milieux nutritifs, parmi lesquels j'employais de préférence les tubes de gélatine, la gélose glucosée inclinée, les grandes boîtes du milieu *Conradi-Drigalski*, le lait, le bouillon additionné de morceaux de blanc d'œuf coagulé (milieu d'Achalme). L'isolement des colonies se faisait sur des plaques de gélatine. Dans certains cas, les matières furent ensemencées dans des tubes de gélose profonde (méthode Liborius-Veillon) ou dans des milieux spéciaux, tels que les solutions de tryptophane, de tyrosine, etc.

A quelques rares exceptions près, les déjections provenaient d'enfants nourris au biberon exclusivement ou bien au biberon et au sein.

Le plus souvent les fèces examinées étaient nettement diarrhéiques, de couleur verte franche ou mélangée de jaune et de brun. Rarement elles étaient plus épaisses, grises ou blanchâtres, de consistance pâteuse. Deux fois seulement elles étaient légèrement sanglantes. Sur 134 cas, la réaction acide a été observée 70 fois (52,5 p. 100), la réaction alcaline 49 fois (36,5 p. 100), la réaction neutre ou amphotère 15 fois (11 p. 100).

Au microscope, on pouvait constater, ainsi que nous l'avons déjà mentionné, une grande prédominance de bactéries ne prenant pas le Gram, parmi lesquelles les coccobacilles de

(1) Plusieurs de ces couches lavées, ainsi que le talc avec lequel on saupoudre les nourrissons, ont été étudiés par moi au point de vue bactériologique. Jamais je n'y ai trouvé du *Proteus*. Outre des bacilles à spores, ce sont les staphylocoques qui y prédominaient.

diverses dimensions étaient les plus nombreux (fig. 2). Dans un certain nombre de cas, nous avons observé des amas de tout petits cocci (voisins du *Staphylococcus parvulus*) isolés et étudiés par Wollman. Des spirilles (*Spirochæte*) très minces n'étaient pas rares. Parmi les bactéries retenant le Gram, le *bifidus* était le plus fréquent. Ce n'est que tout à fait exceptionnellement qu'il se trouvait en abondance. Le plus souvent il était en quantité réduite et dans un certain nombre de cas il étonnait par son absence complète. Après le *bifidus*, ce sont les sarcines prenant le Gram qui étaient les plus fréquentes. A côté d'elles on remarquait des staphylo-, diplo et des streptocoques, présentant souvent l'aspect d'entérocoques. Les bacilles sporulés ne se rencontraient que rarement. Plus fréquents étaient les bacilles sans spores prenant le Gram, parmi lesquels les acidophiles, le bacille de Welch (*perfringens*) et les *mesentericus*. Dans 149 cas, notés parmi les microbes résistant au Gram, nous avons compté 51 fois les sarcines, 13 fois le *B. Welchii*, 9 fois les bacilles sporulés (*Sporogenes*, etc.), 4 fois les bacilles mésentériques, 2 fois les acidophiles, 2 fois le *Clostridium butyricum*, 4 fois les Oïdium et une fois les levures. Les *bifidus* et les *cocci* étaient fréquents. Dans la flore négative au Gram, nous avons rencontré 12 fois des spirochètes et des formes vibrioniennes, 9 fois le pyocyanique. Les coccobacilles ne pouvaient être distingués qu'à l'aide de cultures. Sur le milieu *Conradi-Drigalski*, les colibacilles poussaient dans tous les cas sous forme de colonies rouges isolées ou bien en nappe rose uniforme, entourée de colonies éparses. Moins fréquent était le *B. lactis aerogenes* avec ses colonies en tête de clou, blanches, avec un fond rouge vif et les cocci avec leurs petites colonies rouges. Les colonies bleues étaient beaucoup moins fréquentes ; le paratyphique B n'a été isolé que dans quatre cas. Le bacille dysentérique n'a été trouvé qu'une seule fois, dans des selles tachées de sang. Dans le second exemple de matières sanglantes, sa présence n'a pas pu être démontrée.

Beaucoup plus fréquent sur le même milieu était le *Proteus*, qui apparaissait sous forme de voile mince de couleur bleu clair ; se répandant sur la périphérie, il présentait un aspect rayé très caractéristique. Par contre, les colonies isolées du *Proteus* étaient rares. Seulement, pour obtenir cette bactérie,

le milieu *Conradi-Drigalski* n'est point favorable. Dans ce but, les cultures sur gélose inclinée, sur gélatine par piqûre ou en bouillon avec blanc d'œuf coagulé, sont de beaucoup préférables. En ensemençant (d'après la méthode de Choukevitch) (1) un peu de matières dans la profondeur de tubes de gélose inclinée, on observe le lendemain un développement abondant de *Proteus* sous forme d'un enduit montant jusqu'au sommet de la gélose souvent avec des stries parallèles (fig. 3).

Cette méthode suffit dans la plus grande majorité des cas pour établir l'existence du *Proteus* dans les fèces. Mais les exemples ne sont pas très rares où il faut recourir à d'autres procédés. Le meilleur, dans ces cas, consiste dans l'ensemencement par piqûre d'un peu de déjections dans la gélatine. Avec les déjections des nourrissons, cette dernière se liquéfie toujours peu de temps après, ce qui dépend soit du *Proteus*, soit d'autres microbes, tels que sarcines, staphylocoques, *mesentericus* ou moisissures. Il faut donc ensemencer des plaques de gélatine avec la partie liquéfiée de la gélatine du premier ensemencement en tubes. La même méthode doit être employée pour l'isolement de bacilles du groupe du *Proteus* qui ne montent pas sur la surface de la gélose (fig. 4). Ces derniers bacilles, sans être fréquents, se rencontrent quelquefois dans la diarrhée des nourrissons (2). En examinant les plaques il faut tenir compte de la très grande variabilité des colonies du *Proteus*. A côté de colonies classiques, munies de leurs prolongements, il y en a qui ne donnent pas du tout d'appendices et d'autres qui, au début, présentent une grande analogie avec les colonies du colibacille. Ce n'est qu'au moment de la liquéfaction de la gélatine que la différenciation peut se faire sans difficulté (fig. 5-7). Voici le relevé des cas dans lesquels j'ai isolé les *Proteus* :

En 1909 sur 36 cas	32 avec *proteus*.
En 1910 sur 34 cas	32 avec *proteus*.
En 1911 sur 81 cas	78 avec *proteus*.
En 1912 sur 47 cas	44 avec *proteus*.
En 1913 sur 20 cas	18 avec *proteus*.
218 cas	204 avec *proteus*.

(1) Ces *Annales*, 1911, p. 255.

(2) Sur 204 cas de *Proteus*, la variété qui ne monte pas sur la gélose inclinée n'a été rencontrée que cinq fois ou environ 2,5 p. 100. Mlle Rivkind en va faire une description détaillée.

C'est donc dans la presque totalité des cas, soit dans 93,6 p. 100, que le *Proteus* se rencontre dans les diarrhées des nourrissons. Nous l'avons trouvé dans toutes les épidémies estivales de ces cinq dernières années, et nous l'avons isolé dans des cas de gastro-entérite en d'autres saisons. Ainsi, en 1910, nous avons rencontré ce microbe 4 fois sur 5 cas de diarrhée hivernale, 8 fois sur 9 cas de diarrhée printanière, 16 fois sur 16 cas de diarrhée estivale et 4 fois sur 4 cas de diarrhée automnale.

En dehors des déjections des nourrissons atteints de choléra infantile, nous avons examiné quatre cadavres provenant de cette maladie. Deux cas ont été fournis par la grande épidémie de 1911 et se rapportent aux cadavres autopsiés à l'hôpital des Enfants-Malades, par le Dr Tixier. Un de ces nourrissons, un garçon de treize jours, avait dans ses intestins, grêles et gros, du liquide rempli de coccobacilles Gram-négatifs (fig. 8). Un autre, une fillette de trois mois, présentait à l'autopsie un peu d'épanchement péritonéal jaunâtre et du liquide dans l'intestin grêle. Le côlon renfermait du mucus. Dans l'exsudat péritonéal dominaient des gros coccobacilles Gram négatifs et dans le contenu des intestins des coccobacilles ne prenant pas le Gram, de dimensions moyennes et petites (fig. 9).

Les deux autres cadavres provenaient de l'hôpital Pasteur. Le premier, garçon de huit mois, mort de « gastro-entérite aiguë », a présenté à l'autopsie une infiltration tuberculeuse du poumon droit et, en plus, des lésions intestinales typiques. L'intestin grêle et le côlon étaient remplis de liquide dans lequel pullulaient les coccobacilles Gram-négatifs.

Le dernier de nos cas se rapporte à un garçon de treize mois et demi. Les seules lésions constatées à l'autopsie concernent l'intestin grêle avec sa muqueuse légèrement œdématiée et les plaques de Peyer un peu tuméfiées. M. Salimbeni, qui a fait cette autopsie, a été frappé par l'analogie de ces lésions avec celles qu'il a récemment trouvées chez le chimpanzé n° V de nos expériences.

Au point de vue bactériologique nous devons signaler la présence du *Proteus* dans le contenu des intestins grêles et gros de ces quatre cadavres, confirmée par les cultures sur les milieux appropriés.

Il est intéressant à noter que, bien que Bahr (*loc. cit.*) ne soit point partisan du rôle du *Proteus* dans le choléra infantile, il décrit un cas dans lequel le contenu intestinal d'un nourrisson de trois mois mort de diarrhée n'a donné que des colonies de ce microbe.

De tous les cas de diarrhée des nourrissons que nous avons étudiés, il en est resté quatorze dans lesquels nous n'avons pu isoler aucune race de *Proteus*. Dans quelques-uns de ces exemples nous avons essayé, sans succès, tous nos procédés, même les plus perfectionnés. Dans plusieurs de ces cas négatifs il s'est agi d'enfants atteints de broncho-pneumonie, de bronchite et de varicelle, accompagnées pour la plupart de diarrhée verte.

Ces exemples suffisent à démontrer que les *Proteus* ne font pas partie de la flore constante du nourrisson comme le *bifidus* ou le colibacille. L'étude des microbes intestinaux des nourrissons bien portants confirment cette conclusion. Il n'est pas possible d'accepter l'opinion de Schmidt et Strasburger (1), d'après laquelle « le *Bacillus proteus vulgaris* ne se trouve jamais chez les nourrissons normaux », à moins que l'on ne restreigne l'idée qu'on se fait d'un nourrisson normal. Chez des nourrissons bien soignés, au sein, au biberon ou au régime mixte, on ne trouve pas de *Proteus* en règle générale, bien que leurs matières fécales liquéfient la gélatine d'une façon plus ou moins rapide et abondante. Chez une fillette âgée de quelques semaines, bien portante, les fèces obtenues à plusieurs reprises, normales, de couleur dorée, qui renfermaient peu de *bifidus* mais beaucoup de *Bacillus acidophilus*, n'ont pas permis l'isolement du *Proteus* malgré les efforts les plus assidus. La liquéfaction très modérée de la gélatine avait pour cause la présence d'un *Glycobacter proteolyticus*, décrit par Wollman (2). Chez une fillette nourrie au sein et chez deux autres enfants nourris au sein et au biberon, et élevés avec le plus grand soin, des recherches très prolongées n'aboutirent jamais à l'isolement du *Proteus*. Un de ces nourrissons présentait de temps en temps des poussées de

(1) *Die Fäces des Menschen*, 3e édition, 1910, p. 363.
(2) Ces *Annales*, 1912, p. 610.

diarrhée jaune ou verte, sans que pour cela le *Proteus* fît son apparition. Le médecin traitant expliquait cette diarrhée par l'extrême nervosité et l'inquiétude de la mère. Chez l'autre nourrisson de cette série, sept selles d'aspect normal, prises dans l'espace de six mois, ne laissèrent jamais apercevoir le vrai *Proteus*, liquéfiant la gélatine. Quelquefois seulement, après plusieurs jours de développement, on pouvait remarquer quelques prolongements caractéristiques, dus au *Proteus Zenkeri*, non protéolytique. La liquéfaction abondante de la gélatine chez cet enfant était due au développement de Sarcines et de Staphylocoques.

Par contre, chez une fillette nourrie au sein, dans les déjections de couleur dorée, quoique liquides, déjà six semaines après la naissance, j'ai pu observer facilement sur des tubes de gélose inclinée le développement typique du vrai *Proteus vulgaris*, et cela malgré une grande abondance de *bifidus* (fig. 10). Cette enfant, prise de temps en temps de poussées diarrhéiques, s'est développée d'une façon normale.

Chez un autre enfant qui m'avait été apporté comme bien portant et qui dès la naissance était nourri au biberon, les matières, tantôt acides, tantot alcalines, toujours fétides, contenaient une flore apparemment anormale. Au lieu du *bifidus*, elles renfermaient du *Bacillus sporogenes*, des bacilles avec spores du type Rodella III, et surtout beaucoup de coccobacilles ne prenant pas le Gram, parmi lesquels du vrai *Proteus vulgaris*. Cette flore n'a pas empêché l'enfant de se développer, bien qu'il soit pâle et présente une apparence chétive.

Sur les six enfants « normaux » que je viens de mentionner, deux étaient porteurs du *Proteus*, ce qui correspond à 33,3 p. 100.

Bien plus forte était la proportion de nourrissons renfermant ce microbe parmi les enfants de la pouponnière de Porchefontaine, près de Versailles (1). Ces nourrissons au régime mixte (sein et biberon avec du lait cru pendant la saison froide) nous ont fourni des matières fécales pour la grande part fétides et de mauvais aspect : parfois diarrhéiques, souvent

(1) Nous adressons nos meilleurs remerciements au Dr Pajon, qui nous a fourni les matériaux de recherches de la pouponnière.

pâteuses et grisâtres, en grande quantité alcalines (20 alcalines contre 13 acides). Eh bien, sur ce nombre de 33 nourrissons, 18, c'est-à-dire 57,5 p. 100, étaient porteurs du *Proteus vulgaris*, proportion beaucoup plus forte que celle que nous avons constatée chez les nourrissons dans leurs familles. D'après l'attestation du médecin de la pouponnière, les enfants se développaient de façon normale. Beaucoup de leurs matières renfermaient une grande quantité de *bifidus* avec un nombre restreint de coccobacilles se décolorant par le Gram (fig. 11); mais un assez grand nombre d'enfants avaient une flore remplie de ces coccobacilles et anormale sous bien d'autres rapports (fig. 12). Il est important d'ajouter qu'à la pouponnière en question les enfants se trouvent réunis par 40 dans la même salle. Malgré la facilité de la contagion dans ces conditions, la quantité de porteurs de *Proteus* (57,5 pour 100) était beaucoup moins forte que parmi les nourrissons atteints de gastro-entérite (93,6 p. 100).

Etant donné que l'agent étiologique de cette maladie doit se trouver parmi les bactéries se décolorant par le Gram et dans l'impossibilité d'attribuer ce rôle aux paratyphiques ni aux dysentériques, c'est surtout les *Proteus* qui doivent attirer notre attention. Voyons pour cela les résultats de nos recherches expérimentales sur le choléra des nourrissons.

III

BACTÉRIOLOGIE DU CHOLÉRA INFANTILE EXPÉRIMENTAL VIRULENCE DU PROTEUS ADMINISTRÉ PAR LA BOUCHE

L'alimentation des animaux ayant pris, dans nos expériences, le choléra des nourrissons, était très diverse. Les anthropoïdes étaient soumis au régime végétal, composé de bananes et de pain, tandis que les petits lapins ne se nourrissaient que du lait de leurs mères. Il est naturel que, dans ces conditions, leur flore intestinale ait présenté des différences très grandes.

Les déjections tout à fait normales du premier de nos chimpanzés (I., prélevées avant l'expérience (fig. 13), accusaient une notable quantité de bacilles, de diplo- et streptocoques, prenant la coloration de Gram. Parmi les bactéries négatives au

Gram, on remarquait quelques bacilles, un nombre considérable de spirilles et de coccobacilles. Avec la diarrhée, l'aspect du contenu intestinal changea dans de fortes proportions. Les déjections devinrent liquides et glaireuses, mélangées de résidus de bananes. Il est remarquable qu'elles renfermaient une très grande quantité de leucocytes, parmi lesquels prédominaient les polynucléés, c'est-à-dire qu'elles présentaient les mêmes particularités que les selles du nourrisson ayant servi pour l'expérience (fig. 14). Quant à la flore, sa modification fondamentale sautait aux yeux. Tandis que les spirilles avaient totalement disparu, les coccobacilles négatifs au Gram avaient augmenté en forte proportion. Les plaques de gélatine ensemencées avec les déjections normales (fig. 15) et diarrhéiques (fig. 16) de chimpanzé ont révélé que cette augmentation de coccobacilles était due aux bactéries liquéfiantes, qui n'étaient autres que les *Proteus*. Ce microbe, absent des matières normales, s'est trouvé en quantité dans les matières diarrhéiques.

Chez un autre chimpanzé (II) ayant pris la diarrhée à la suite de l'ingestion des fèces du premier, la modification de la flore était semblable. Le même phénomène s'est reproduit chez un troisième chimpanzé (IV) de nos expériences. Absent dans les déjections normales, le *Proteus* s'est montré abondant dans les matières diarrhéiques.

Le dernier de nos chimpanzés (V), qui ait contracté le choléra des nourrissons expérimental, a été étudié avec beaucoup de précision au point de vue de sa flore intestinale. Ses déjections normales (fig. 17) se distinguaient par l'abondance de bacilles prenant le Gram, ainsi que par une masse de spirilles très fins, réfractaires à cette méthode; les coccobacilles Gram-négatifs étaient particulièrement rares. Sur les milieux de culture, ces derniers se révélèrent comme des colibacilles et des *lactis aerogenes*. Quant aux *Proteus*, il nous a été impossible de les trouver, malgré l'emploi de toutes les méthodes à notre disposition. Tout différent était le résultat de l'examen des matières diarrhéiques du même animal. Au microscope (fig. 18), celles-ci se présentèrent constituées surtout de microbes Gram-négatifs. Les spirilles étaient devenus rares et modifiés dans leur apparence, tandis que les coccobacilles occupaient la plus grande partie de la préparation. Sur des milieux de

cultures, le *Proteus vulgaris* se développait abondamment. Dans le courant de la maladie, ce microbe poussa toujours en quantité dès que les matières devinrent de nouveaux diarrhéiques. A l'autopsie, le contenu du jéjunum, de l'ileum et du cæcum nous a donné des cultures abondantes et absolument caractéristiques du même *Proteus*.

Chez l'orang-outang qui a servi à nos expériences et qui a contracté la diarrhée mortelle, les modifications de la flore étaient comparables à celle des chimpanzés. Dans les déjections normales prélevées avant l'administration des selles de nourrisson malade, le nombre des coccobacilles Gram-négatifs était restreint, bien inférieur à celui des bactéries prenant le Gram, surtout du *bifidus* (fig. 19). Les tentatives pour obtenir des cultures du *Proteus* n'amenèrent que tardivement un très faible développement de ce microbe. Pendant la diarrhée et à l'autopsie, par contre, le *Proteus vulgaris* poussait rapidement jusqu'au sommet de la gélose inclinée. Sur des frottis du contenu de l'intestin grêle (fig. 20) et du cæcum, les coccobacilles Gram négatifs étaient prépondérants. Il est intéressant de comparer les cultures en gélatine du *Proteus* chétif isolé des matières normales avec celui qui s'est développé à partir des selles diarrhéiques du même orang-outang (photogr., fig. 21).

Chez les petits lapins qui ont pris le choléra infantile à la suite de l'ingestion de matières diarrhéiques des nourrissons, les intestins renfermaient des masses de coccobacilles négatifs au Gram (fig. 22) qui se révélèrent en culture comme de vrais *Proteus*.

En présence de tous ces faits confirmant le rôle important du *Proteus*, rôle qui s'imposait déjà à la suite des recherches sur la flore des nourrissons, il a été très important d'étudier l'influence des cultures pures de ce microbe d'abord sur les anthropoïdes.

On savait déjà que le *Proteus* est pathogène après ingestion. Schumburg (1) a obtenu une infection mortelle des souris et des rats à l'aide de cultures du *Proteus* sur viande. Dieudonné (2) a tué des souris avec des cultures pures du même microbe sur

(1) *Zeitschrift f. Hygiene*, 1902, vol. XLI, p. 184.
(2) *Deutsche militärärztliche Zeitschrift*, 1904, p. 184 et *Würzburger Abhandlungen*, 1908, p. 59.

des tranches de pomme de terre. Par contre, ses rats, cobayes et lapins se sont montrés réfractaires.

Dans ses études très intéressantes sur la diarrhée des jeunes veaux, Jensen (1) a rencontré dans un certain nombre de cas du *Proteus* qui provoqua la maladie de ces animaux par introduction des cultures pures dans la bouche.

Un de nos jeunes chimpanzés, bien portant et déposant des déjections normales, a reçu à deux reprises, par la bouche, plusieurs échantillons de cultures du *Proteus*, isolées d'enfants atteints de diarrhée et de chimpanzé ayant contracté la gastro-entérite expérimentale des nourrissons. Quatre jours après la première absorption de microbes, l'animal, sans présenter de diarrhée, a été subitement pris de coma et est entré en agonie avec une température rectale de 35 degrés. A l'autopsie, pratiquée par le Dr Salimbeni, le cœur et les poumons se sont montrés normaux. L'estomac renfermait un liquide jaunâtre dans lequel nageaient des grumeaux de mucus. L'intestin grêle a présenté une forte congestion de couleur rappelant celle d'hortensia. Quelques plaques de Peyer, pâles, étaient entourées d'un halo rose. L'intestin grêle renfermait un liquide jaunâtre muqueux avec des grumeaux. Le cæcum était légèrement hyperémié, avec un contenu semi-liquide couleur ocre jaune. Tout le côlon était rempli de matières de même couleur, de consistance molle. Le rectum contenait des matières dures. D'après M. Salimbeni le tableau rappelait celui du choléra asiatique sec de l'homme. Toutes les parties du tube digestif renfermaient des quantités de bacilles *Proteus*.

Un second chimpanzé jeune, auquel nous avons donné à plusieurs reprises à absorber de la gélatine liquéfiée ensemencée avec des déjections de nourrissons atteints de gastro-entérite, présenta de la constipation et ne mourut que douze jours après le début de l'expérience. A l'autopsie, il présenta des lésions tuberculeuses du poumon gauche et plusieurs gros Ascaris. Le résultat de cette expérience reste donc douteux, mais celui de la première indique bien le rôle pathogène du *Proteus*.

(1) Kolle und Wassermann. *Handbuch d. pathog. Mikroorganismen*, 2e édition. 1913, vol. VI, p. 138.

Étant donnée la sensibilité des lapins à la mamelle au choléra des nourrissons, nous avons continué nos expériences sur ces animaux, beaucoup plus faciles à se procurer que les anthropoïdes. Six nichées de lapins, âgés de deux et trois jours, ont reçu dans la bouche le produit de la centrifugation de cultures du *Proteus vulgaris* dans du bouillon peptoné, additionné de morceaux de blanc d'œuf coagulé. Deux lapins d'une nichée ont supporté l'épreuve sans conséquences, tandis que les cinq autres ont présenté des phénomènes d'infection mortelle. Dans trois nichées, tous les lapins (7, 3 et 6) sont morts deux à trois jours après avoir absorbé du *Proteus*, tandis que dans deux autres, une partie seulement des petits lapins ont contracté la maladie mortelle (6 morts sur 20 lapins).

En somme, sur 37 petits lapins, 22 sont morts infectés par le *Proteus*. A l'autopsie, presque tous accusèrent une hyperémie de l'intestin grêle, sans présenter les autres signes du choléra expérimental. L'estomac était vide de lait, au lieu duquel il ne renfermait que du mucus. Le cæcum n'était distendu que dans des cas rares. Un lapin seulement donna des signes de diarrhée.

Bien que ces expériences constatent le pouvoir infectieux des cultures pures du *Proteus*, elles montrent d'un autre côté que la maladie causée par ce microbe n'est pas pareille à celle que l'on donne aux lapins à la mamelle avec des déjections de nourrissons, pris de choléra infantile. Ce fait nous a fait supposer que, dans ce dernier cas, l'action pathogène du *Proteus* était secondée par celle de quelque autre microbe.

Une de nos expériences nous avait fourni une indication dans ce sens. Parmi nos petits lapins infectés par des cultures pures du *Proteus*, il s'en est trouvé un qui présenta à l'autopsie une analogie frappante avec le choléra expérimental : l'estomac était rempli d'une quantité de lait coagulé très acide ; l'intestin grêle très hyperémié par endroit était rempli de mucosité liquide, en partie sanguinolente ; le cæcum était très distendu par un liquide clair renfermant des grumeaux jaunes ; la vessie était vide : bref, le tableau typique du choléra asiatique et du choléra des nourrissons chez les petits lapins. Eh bien, sur des préparations et sur des cultures, à côté d'une quantité de *Proteus*, on pouvait apercevoir un grand nombre de bacilles de Welch (*perfringens*).

Guidé par ce résultat, nous avons administré par la bouche, à deux nichées de petits lapins âgés de deux et quatre jours, des cultures du *Proteus* mélangées à celles du *Bacillus Welchii*. Les douze lapins de ces deux expériences sont tous morts d'infection. Tandis que les animaux dans une nichée présentaient les signes typiques du choléra expérimental (diarrhée, hyperémie de l'intestin grêle, cæcum distendu par le liquide diarrhéique), ceux de l'autre étaient moins caractéristiques sous ce rapport; mais, chez eux aussi, l'autopsie révéla une analogie beaucoup plus grande avec le choléra que chez les lapins morts à la suite de l'ingestion de *Proteus* seul.

Un résultat semblable nous a été donné par une expérience avec deux lapins à la mamelle auxquels nous avons administré par la bouche des cultures de *Proteus*, de *B. Welchii* et de colibacilles. Tous les deux sont morts, mais un seul parmi eux accusa les caractères très prononcés du choléra. Dans une autre expérience, dans laquelle neuf lapins âgés de cinq jours avalèrent des cultures du *Proteus*, de *B. Welchii* et d'une sarcine jaune isolée d'un nourrisson malade, trois moururent dans l'espace de trois jours. Deux surtout présentèrent des signes des plus typiques du choléra avec diarrhée, congestion de l'intestin grêle et aspect du cæcum rempli de liquide diarrhéique.

Sans entrer dans plus de détails sur ces expériences, nous pouvons formuler la conclusion que le *Proteus seul, capable d'amener l'infection mortelle chez les lapins à la mamelle, provoque une infection typique du choléra lorsqu'il est associé à d'autres microbes, notamment au bacille de Welch.* Or, ainsi que nous l'avons mentionné dans le second chapitre, ce microbe se rencontre quelquefois (13 fois sur 149 de nos cas) dans le choléra infantile, mais il est loin d'accompagner toujours ce dernier. Les sarcines se rencontrant beaucoup plus souvent dans cette maladie (51 fois sur 149 cas), nous pensons qu'elles peuvent exercer une action favorable sur l'infection protéique, et cela d'autant plus que nous avons constaté leur rôle dans le choléra asiatique des petits lapins (1). Cepen-

(1) Ces *Annales*, 1894, p. 559. Dans un aperçu de ce travail rapporté d'une façon inexacte par Kolle et Schürmann (Kolle und Wassermann, *Handbuch d. pathogenen Mikroorganismen*, 2e éd., t. IV, 1913, p, 39), ces auteurs supposent que j'ai abandonné mon opinion sur le rôle des microbes favorisants dans le

dant, dans une expérience où ces animaux avalèrent un mélange de *Proteus* et de sarcines, le résultat a été nul. Il en a été de même dans une autre expérience où plusieurs lapins à la mamelle reçurent par la bouche un mélange de *Proteus*, de sarcines, de colibacilles et de *lactis aerogenes*, provenant de nourrissons atteints de gastro-entérite.

Le meilleur résultat dans nos recherches a été obtenu par l'association du *Proteus* avec le bacille de Welch. Ce dernier, administré seul aux petits lapins, s'est montré inefficace.

Et pourtant cette combinaison n'est évidemment pas la seule capable de favoriser le *Proteus*. Sous ce rapport, je dois citer les très intéressantes recherches d'Alb. Berthelot (1), chimiste de notre service, sur l'association des *Proteus vulgaris* avec un bacille du groupe du *lactis aerogenes*, *B. aminophilus*, isolé par lui en collaboration avec D. Bertrand, dans quelques cas de troubles intestinaux chez l'homme adulte. Il a démontré que ces deux microbes, administrés séparément par la bouche à des rats jeunes et adultes, ne leur causaient pas de troubles, par contre provoquaient une entérite grave et souvent mortelle lorsque les rats les avalaient tous les deux à la fois.

Si c'est le *Proteus* qui est l'agent du choléra infantile, comment peut-on expliquer le fait que, dans un grand nombre de cas, parmi lesquels il faut compter ceux des dernières épidémies étudiées par Bahr, Gildemeister et Baerthlein, il n'a pu être constaté ? Étant donné que, pendant cinq ans, ce microbe a été trouvé dans l'immense majorité des cas parisiens, il est bien improbable qu'il fût réellement absent dans les épidémies antérieures, étudiées par des bactériologistes de la plus grande valeur. Il faut plutôt admettre que leurs résultats négatifs dépendaient de leurs méthodes de recherches. Les tubes de gélose par le procédé de Veillon sont très utiles pour l'étude des anaérobies, surtout du *bifidus*, mais ils sont tout à fait

choléra asiatique. Cette supposition sans base est absolument contraire à la vérité, car je reste persuadé du rôle des plus importants des microbes empêchant et favorisant le vibrion de Koch. Mes expériences sur le choléra des nourrissons fournissent une nouvelle preuve de l'importance des microbes favorisants dans les maladies du tube digestif. Mme Horowitz (*Centralb. f. Bakteriologie*, 1911, t. LVIII, p. 79) a confirmé par des recherches très intéressantes le rôle favorisant des sarcines dans le choléra asiatique.

(1) Recherches sur quelques caractères du *Proteus vulgaris*. Thèse pour le doctorat en médecine. Laval, 1913, p. 69. Ces *Annales*, 1914, p. 132, ci-dessous

insuffisants pour l'isolement du *Proteus*. C'est évidemment pour cela que Tissier (1), qui se servait surtout de cette méthode, ne rencontrait pas le *Proteus*. La même remarque s'applique à Nobécourt, dont la méthode était applicable surtout à la recherche des colibacilles ; ainsi qu'à Bahr, Gildemeister et Baerthlein et à tant d'autres bactériologistes. Leurs milieux de culture (gélose lactosée au tournesol, plaques de *Conradi-Drigalski* etc.), excellents pour l'isolement des colibacilles et des paratyphiques, ne peuvent servir que rarement pour l'étude des *Proteus*. Que de fois ces milieux se présentaient dans mes études exempts de ce microbe qui, cependant, poussait très bien en tubes de gélose inclinée ou en gélatine ! Lorsque D. M. Bertrand (2), de notre service, alla à Londres, muni de bonnes méthodes, pour étudier le choléra des nourrissons, il constata le *Proteus vulgaris* dans tous les 55 cas de cette maladie, tandis qu'il n'en trouva que deux fois chez 24 nourrissons bien portants, ayant servi de témoins. De même Mlle Tsiklinsky, qui s'est chargée d'étudier le choléra infantile à Moscou, constata la présence du *Proteus* dans 65 p. 100 des cas de cette maladie.

Puisque, à Londres, à Paris et à Moscou, c'est le *Proteus* qui se rencontre abondamment dans les diarrhées infantiles, il faut croire qu'avec de bonnes méthodes on le retrouvera aussi dans les pays intermédiaires tels que le Danemark et l'Allemagne. Malgré l'emploi de milieux insuffisants, Gildemeister et Baerthlein ont rencontré le *Proteus* chez 31 p. 100 de leurs enfants malades à Berlin. L'application des méthodes plus appropriées relèvera considérablement ce chiffre, d'autant plus que Baginsky (3) a trouvé chez presque tous les nourrissons atteints de diarrhée, dans son service, à Berlin, un bacille liquéfiant la gélatine qui n'était autre que le *Proteus*.

De l'ensemble des faits que nous avons réunis dans ce mémoire, il résulte que *le principal microbe dans les diarrhées des nourrissons est le* Proteus. *Sa présence quasi constante dans*

(1) *Recherches sur la flore intestinale des nourrissons*. Paris, 1900, et ces *Annales*, 1908, p. 189. La même remarque s'applique au travail de Sittler, dans le *Centralb. f. Bacteriologie.*, I, section, Originale, 1908, t. XLVII, p. 14 et 145.

(2) V. cette même livraison de ces *Annales*, p. 121, ci-dessous.

(3) *Deutsche med. Wochenschr.*, 1888, n° 20.

nos cas de cette maladie, ainsi que son rôle pathogène lorsqu'il est administré par la voie buccale, soit seul, soit associé à d'autres microbes, démontrent son importance prépondérante.

IV

ANALOGIE ENTRE LE CHOLÉRA DES NOURRISSONS ET LE CHOLÉRA ASIATIQUE MESURES PROPHYLACTIQUES, BASÉES SUR LA BACTÉRIOLOGIE DU CHOLÉRA INFANTILE

Dans le cours de ces études, nous avons à plusieurs reprises insisté sur la grande analogie du choléra des nourrissons avec le choléra asiatique. Dans les deux cas, il s'agit d'un microbe principal (vibrion de Koch et *Proteus*), favorisé par des bactéries secondaires associées. Les deux maladies sont incontestablement contagieuses et capables de provoquer l'infection des lapins à la mamelle. Il est vrai que l'on n'a pas encore reproduit le choléra asiatique chez les anthropoïdes, mais il faut bien dire que les tentatives dans cette voie n'ont pas été suffisantes. Nous avons vainement essayé de provoquer le choléra chez deux jeunes chimpanzés auxquels nous avons administré par la bouche des cultures pures de vibrions de Koch. Par contre, on n'a jamais essayé de produire le choléra asiatique en donnant à avaler aux anthropoïdes des matières fécales de cholériques. Dans le choléra infantile, la sensibilité des anthropoïdes a été suffisamment démontrée par nos expériences.

En revanche, on n'a pas expérimenté la virulence des *Proteus* sur l'homme pour lequel cependant ce microbe n'est point inoffensif. On a enregistré plusieurs cas d' « intoxications alimentaires » dans lesquels les aliments incriminés (saucisson, salade de pomme de terre, etc.) étaient remplis de *Proteus* (1). On connaît des exemples de *choléra nostras* dans lesquels l'examen bactériologique a démontré la présence du

(1) Ces cas ont été résumés par Dieudonné dans *Würzburger Abhandlungen* (*loc. cit.*).

même microbe en grande quantité. Emmerich (1) attribue même le *choléra nostras*, en général, à l'infection par le *Proteus*.

L'expérimentation avec ce microbe chez les enfants est naturellement impossible, car personne ne se risquera jamais à leur administrer du *Proteus* notoirement pathogène. Cette lacune, impossible à combler, ne peut être atténuée que par la comparaison avec le choléra asiatique, au sujet duquel un grand nombre d'expériences ont été effectuées sur l'homme. Grâce à ces expériences, le *choléra morbus* est devenu un des chapitres les mieux connus de toute la médecine. Elles ont démontré d'une façon définitive que l'absorption par la bouche des cultures pures du vibrion de Koch est capable de provoquer dans certains cas le vrai choléra chez l'homme, tandis que dans la majorité des autres cas la pénétration des vibrions dans les voies digestives reste sans effet ou ne produit que des troubles sans gravité. Ces expériences expliquent pourquoi des sujets bien portants ou atteints seulement de dérangement du corps insignifiant, peuvent renfermer dans leurs intestins des quantités de vibrions cholériques.

Ces résultats fondamentaux, bien établis pour le choléra asiatique, sont capables de projeter de la lumière sur le choléra infantile. Quoi d'étonnant qu'un certain nombre de nourrissons bien portants ou à peine malades renferment dans leurs déjections des *Proteus*, lorsque sur seize sujets ayant absorbé des vibrions cholériques, quatorze n'ont présenté que des troubles tout à fait légers ou même aucun trouble du tout (2)? De même qu'à côté des sujets cholériques on observe des porteurs de vibrions de Koch, de même, à côté des nourrissons malades on rencontre des porteurs de *Proteus*. L'influence de la flore intestinale sur l'action pathogène du vibion cholérique et du *Proteus* étant certaine, on conçoit facilement la présence de ces deux microbes dans les intestins sans que pour cela les porteurs manifestent le mal. Il est vrai que les porteurs sains des vibrions cholériques sont beaucoup plus rares que les porteurs du *Proteus* ; mais il ne faut pas perdre de vue que le choléra asiatique, en Europe, est une maladie importée qui ne

(1) *The Journal of State Medicine*. Londres, octobre 1913.
(2) Ces *Annales*, 1893 et 1894.

dure que relativement peu de temps, tandis que le choléra infantile est une maladie endémique, persistante. A ce point de vue, il serait intéressant d'étudier la fréquence des porteurs du vibrion dans les pays où le choléra asiatique est endémique au même titre que le choléra infantile et le choléra nostras en Europe.

Après avoir démontré le rôle du vibrion cholérique et du bacille typhique, ainsi que leur présence dans l'eau, on a admis que l'infection dans ces maladies ne pouvait se produire que par l'intermédiaire de l'eau de boisson. Lorsqu'on eut démontré plus tard qu'à côté de cette source d'infection les porteurs de vibrions et de bacilles en constituent une autre, très importante, on s'est trouvé à même d'expliquer un grand nombre de cas d'infection dans lesquels l'eau ne pouvait être incriminée.

En pédiatrie, à l'époque où l'on comptait encore avec les microbes comme cause des diarrhées des nourrissons, on attribuait tout le mal au lait. Le fait que les enfants nourris au lait bien stérilisé ne sont pas exempts de diarrhée a détourné les praticiens des microbes et leur a fait croire que ce sont les produits des échanges nutritifs ou bien la chaleur excessive qui constituent la vraie cause du mal. La constatation définitive du caractère infectieux du choléra infantile permet facilement de concilier certaines contradictions apparentes. Le virus protéique peut être transmis aux nourrissons par l'intermédiaire des porteurs humains ou par les mouches. Sans être l'hôte constant de la flore intestinale humaine, le *Proteus* s'y rencontre assez fréquemment. Cantu (1), dans un travail exécuté dans notre service, l'a trouvé dans 30 p. 100 de selles humaines normales et dans 40 p. 100 de selles diarrhéiques. Souvent ce microbe se trouve dans les intestins du cheval (2), des bovidés et du mouton (3). Cantu l'a rencontré dans 80 p. 100 d'échantillons de crottin de cheval et dans 44 p. 100 de prises de terre de jardin.

Voilà donc plusieurs sources abondantes du *Proteus*. Les mouches qui fréquentent toutes sortes d'excréments dans la

(1) Ces *Annales*, 1911, p. 255.
(2) *Ibid.*, 1911, p. 255.
(3) *Ibid.*, 1913, p. 250, 259.

rue, dans les cours et les latrines, transportent facilement avec leurs pattes des *Proteus* de ces différents endroits sur les aliments. Nous avons isolé le *Proteus* de pain saupoudré de sucre et de raisin très mûr, qui, tous les deux, étaient couverts de mouches friandes. Les fromages, surtout les fromages à pâte molle, contiennent à leur surface du *Proteus* en abondance. Par contre, le lait du commerce, malgré l'affirmation de Mazé qu'il « renferme presque toujours » du *Proteus* (*loc. cit.*, p. 240) n'en contient que rarement. Nous ne l'avons rencontré que dans 10 p. 100 de cas, tandis que Cantu ne l'a trouvé que 7 fois sur 200 échantillons provenant des diverses crémeries de Paris.

En dehors du lait, le *Proteus*, si répandu dans l'entourage de l'homme, trouve facilement moyen de pénétrer dans la bouche du nourrisson. Ce sont les mouches, et surtout les personnes qui donnent leurs soins aux enfants, qui véhiculent le microbe malfaisant. Lorsque Ritschel (*loc. cit.*), dans sa plaidoirie en faveur du rôle direct de la chaleur, s'étonne que l'on puisse penser aux porteurs de virus et insiste sur l'identité des conditions dans lesquelles se trouve le personnel qui entoure les enfants pendant la saison froide et la saison chaude, il oublie qu'en été l'occasion de transmettre des microbes pathogènes est beaucoup plus fréquente qu'en hiver. Les aliments consommés par ce personnel sont beaucoup plus souillés par les mouches pendant la chaleur. Aussi a-t-on souvent observé la corrélation entre la période de la diarrhée des nourrissons et la pullulation des mouches.

Les faits établis dans ce mémoire doivent servir de base à la prophylaxie du choléra infantile. Il serait très important, dans ce but, de tenir les rues, les cours et les latrines aussi propres que possible par l'enlèvement du crottin de cheval et des fumiers de toute sorte, et de détruire les mouches par tous les moyens disponibles. Il est vrai qu'il n'est pas facile d'arriver à la propreté idéale, mais déjà la propreté relative, que l'on peut obtenir sans beaucoup de difficulté, doit agir d'une façon efficace contre la propagation des diarrhées des nourrissons. Il ne faut pas perdre de vue que, dans la contamination par le Proteus, le nombre de germes joue un rôle important. Ainsi, dans les expériences de Berthelot et les nôtres sur la virulence

de ce microbe, avons-nous dû en employer souvent de grandes quantités. Même l'association si meurtrière pour les rats du *Proteus* avec l'*aminophilus* n'était efficace que lorsqu'on administrait des doses répétées et abondantes. Tout ce qui peut diminuer la quantité de virus infectieux doit donc être appliqué avec persévérance.

Etant donné que les mesures d'hygiène, dirigées jusqu'à présent contre le lait et les biberons ont amené déjà une notable diminution de la mortalité infantile, il faut espérer que les précautions contre la saleté des rues, des cours et des maisons donneront des résultats encore meilleurs.

V

CONCLUSIONS

I. — La diarrhée des nourrissons, dont la plus grande partie peut être désignée sous le nom de « choléra des nourrissons », est une maladie infectieuse au même titre que le choléra asiatique, les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes, la dysenterie, etc. Le choléra infantile expérimental des animaux en fournit la preuve définitive.

II — Le choléra infantile présente une très grande analogie avec le choléra asiatique. Ces deux maladies, d'origine microbienne, dépendent beaucoup des conditions externes et internes, telles que la forte chaleur de l'atmosphère, les écarts de régime et les troubles de la digestion.

III. — De même que le choléra asiatique, le choléra des nourrissons présente les formes cliniques les plus variées, commencant par des troubles intestinaux des plus insignifiants et finissant par une maladie meurtrière à bref délai. Il est de toute évidence que, de même que pendant une épidémie de choléra asiatique d'autres diarrhées infectieuses, telles que la fièvre typhoïde, la dysenterie, etc., peuvent coexister en même temps, de même, à côté du choléra infantile, certains nourrissons peuvent être pris de diarrhée d'une autre origine.

IV. — Le choléra infantile expérimental des lapins à la mamelle accuse la plus grande ressemblance avec le choléra asiatique expérimental des mêmes animaux. A l'autopsie, les

deux maladies ne peuvent être distinguées que par l'examen bactériologique.

V. — De même que, dans le choléra asiatique, l'agent étiologique est représenté par le vibrion de Koch, de même, dans le choléra infantile, c'est le *Proteus* avec ses diverses variétés qui est le facteur primaire. Dans les deux choléras, l'action de ces bactéries subit l'influence de la flore du tube digestif. Aussi les cas sont nombreux où l'organisme humain résiste, malgré la présence dans les intestins du vibrion cholérique ou du Proteus, ce qui fait qu'il existe beaucoup de porteurs de germes des deux choléras.

VI. — Le mécanisme intime de l'action pathogène du *Proteus* et des microbes qui le favorisent reste encore à étudier. Si, dans l'avenir, on réussissait à démontrer la participation de quelque microbe filtrant dans le choléra des nourrissons, il n'en resterait pas moins vrai que cette maladie est une maladie infectieuse dans laquelle le *Proteus* joue un rôle des plus importants. Les mesures prophylactiques que l'on peut recommander dès à présent conserveraient toute leur valeur.

VII. — Sans attendre le moment où l'on trouvera quelque remède direct contre le choléra infantile (vaccin, sérum curatif ou quelque médicament chimique), toutes les mesures contre la pullulation du Proteus (propreté des rues, des cours, des latrines, des personnes qui soignent les nourrissons) doivent être mises en vigueur sans retard.

VIII. — Le choléra infantile des nourrissons présente un type des moins compliqués de maladie intestinale d'origine microbienne. Son étude doit servir d'introduction à la recherche des maladies du tube digestif des enfants âgés et des adultes, maladies dans lesquelles l'action microbienne est beaucoup plus complexe et partant plus difficile à élucider.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Frottis de déjections d'un nourrisson atteint depuis un mois de diarrhée et vomissements. — S, Sarcines; *w*, *Bacillus Welchii*; *b*, *bifidus*.

Fig. 2. — Frottis de matières fécales d'un nourrisson de cinq mois, depuis trois jours malade de diarrhée et de vomissements. — S, Sarcines; *w*, *B. Welchii*; *b*, *bifidus*.

Fig. 3. — Culture du *Proteus* montant sur la gélose.

Fig. 4. — Culture d'une race de *Proteus* qui ne monte pas sur gélose. Les deux cultures sont âgées de vingt-quatre heures.

Fig. 5. — Colonies du *Proteus* sur une plaque de gélatine à 10 p. 100, avant la liquéfaction.

Fig. 6. — Quatre autres colonies de *Proteus*, isolées d'un nourrisson atteint d' « entérite catarrhale ».

Fig. 7. — Colonie sur gélose plus âgée, isolée du même nourrisson. — *g*, gélatine liquéfiée.

Fig. 8. — Frottis du contenu liquide de l'iléum d'un nourrisson de treize jours mort de choléra infantile. — *l. a. Bact. lactis aerogenes.*

Fig. 9. — Frottis du contenu liquide de l'iléum d'un nourrisson âgé de trois mois, mort de choléra infantile. — *l. a, Bact. lactis aerogenes.*

Fig. 10. — Frottis de déjections liquides, de couleur jaune d'or, d'une fillette âgée de six semaines. Ces matières ont donné en culture du *Proteus*. — S, Sarcines; *b*, *bifidus*.

Fig. 11. — Frottis de déjections d'un nourrisson de la pouponnière de Porchefontaine, âgé de deux mois, nourri au sein et au lait cru, et ne renfermant pas de *Proteus*.

Fig. 12. — Frottis de déjections très fétides et très alcalines d'un nourrisson ayant eu la fièvre (39 degrés) sept jours auparavant. Nourri au lait bouilli à la pouponnière de Porchefontaine. Abondance de *Proteus* dans les matières.

Fig. 13. — Frottis de matières fécales normales d'un jeune chimpanzé (I avant l'expérience. Pas de *Proteus* dans les déjections.

Fig. 14. — Frottis de déjections diarrhéiques du même chimpanzé I, remarquables par l'abondance des leucocytes et de *Proteus*.

Fig. 15. — Photographie d'une plaque de gélatine ensemencée avec des déjections normales du chimpanzé I.

Fig. 16. — Photographie d'une plaque de gélatine ensemencée avec des déjections diarrhéiques riches en *Proteus* du même chimpanzé.

Fig. 17. — Frottis de déjections normales du chimpanzé V avant le début de l'expérience. Pas de *Proteus*.

Fig. 18. — Frottis des déjections diarrhéiques du même chimpanzé V, avec abondance de *Proteus*.

Fig. 19. — Frottis de déjections normales d'un jeune orang-outang avant le début de l'expérience, — *b. bifidus*.

Fig. 20. — Frottis du contenu de l'intestin grêle du même animal. Prédominance des coccobacilles négatifs au *Gram*.

Fig. 21. — Photographie d'une culture en gélatine du *Proteus* isolé des selles normales du même orang-outang.

Fig. 22. — Photographie d'une culture en gélatine du *Proteus* isolé des déjections diarrhéiques du même animal. Les cultures des fig. 21 et 22 ont été ensemencées en même temps.

Fig. 23. — Frottis du contenu du cæcum d'un lapin à la mamelle mort de choléra infantile expérimental.

RECHERCHES SUR LA FLORE INTESTINALE DANS LA DIARRHÉE DES NOURRISSONS

par D.-M. BERTRAND.

(Laboratoire du Professeur Metchnikoff.)

Pendant une partie de l'été 1912, j'ai eu l'occasion de faire à Londres quelques recherches sur la flore intestinale dans la diarrhée des nourrissons.

Cette affection, si fréquente et si meurtrière chez les très jeunes enfants, présente, en général, au cours de l'été, un véritable caractère épidémique. En effet, il est manifeste que l'influence de la chaleur joue un rôle important sur cette maladie, qui sévit plus souvent et avec une gravité plus grande pendant les mois chauds. Cependant, il n'en existe pas moins des formes généralement plus bénignes, mais ayant, d'une façon atténuée, les mêmes symptômes pendant presque toute l'année, même en hiver.

D'ailleurs, au cours de l'été 1912, les cas furent relativement rares à Londres, sauf à la fin de juillet; le mois d'août, humide et froid, ne présenta qu'un nombre assez faible de malades et presque tous atteints d'une affection plutôt bénigne.

De nombreuses recherches ont été entreprises depuis longtemps pour essayer d'éclairer l'étiologie de cette maladie.

Les divers auteurs qui ont fait des études sur ce sujet n'ont pu jusqu'ici se mettre d'accord sur l'agent infectieux qui pouvait en être la cause.

Les premières recherches faites autrefois, à une époque où la flore intestinale était à peine connue, n'ont guère permis de trouver autre chose que le *Bacillus coli*.

Cependant Booker (1), en Amérique, étudia cette affection et, dans les cas les plus graves, à côté du colibacille, il isola constamment le *Bacillus Proteus vulgaris*, qu'il ne put obtenir dans

les autres cas. Depuis cette époque, de nombreux bactériologistes américains (2) ont continué ces recherches, et dans toutes les épidémies ils ont trouvé de façon pour ainsi dire unanime le bacille dysentérique du type Flexner.

Il semble bien qu'en Amérique, tout au moins si l'on s'en rapporte aux recherches bactériologiques, il existe une forme de choléra infantile très différente de ce que nous avons en Europe, car dans les diverses parties du vieux continent où l'on a étudié cette maladie au point de vue bactériologique, le bacille dysentérique a été si exceptionnellement trouvé que personne n'a jusqu'ici été tenté d'en faire l'agent causal de l'infection.

Par contre, de très nombreuses bactéries ont été isolées et chacun a voulu en voir l'agent spécifique. Baginsky a pensé que l'infection était due au *Bacillus pyocyaneus*, que Poels (3) croit être la cause de la diarrhée des veaux. Certains ont cru que les paratyphiques ou le *Bacillus enteritidis* devaient être incriminés. Morgan (4), puis Morgan et Ledingham (5) ont constamment isolé un *Bacillus metacoli I*, qui ne fait pas fermenter le lactose, qui est toxique, et, de plus, serait capable de reproduire la maladie par ingestion chez le rat et le chat.

Enfin, Metchnikoff (6) montra la présence presque constante du *Bacillus Proteus vulgaris* (Hauser) dans cette affection.

Certains auteurs, comme Nobécourt (7), pensent, au contraire, que l'affection est liée primitivement à une lésion ou à un mauvais fonctionnement du tube digestif de l'enfant par insuffisance glandulaire, et que l'action de ces différents microbes ne vient que se surajouter à cette cause véritable. Ces espèces bactériennes peuvent alors, mais secondairement, jouer un rôle important dans les différents phénomènes de la maladie, soit au moyen des putréfactions qu'elles donnent au niveau du tube digestif déjà malade, soit par leurs produits sécrétés, soit enfin par leur pénétration dans le système vasculaire, bien que ce cas semble être très rare.

Les cas que j'ai pu examiner furent au nombre de cinquante-cinq; ils provenaient du Queen's Hospital, de Saint-Bartholomew's Hospital et quelques-uns de Great Ormond street Hospital. A cause des conditions climatériques vraiment mau-

vaises cet été pour l'étude de la diarrhée des nourrissons, les cas que j'ai pu observer, sauf ceux de la fin du mois de juillet qui eut une température assez élevée, ne furent pas des cas typiques de diarrhée verte. Très souvent, les selles des enfants atteints de ces troubles dyspeptiques, au lieu d'être très liquides, étaient soit à l'état de bouillie plus ou moins verdâtre, soit à l'état de selles à peine formées, blanches ou grises, se colorant plus tard d'une teinte verdâtre.

En général, les matières fécales des enfants étaient recueillies dans des tubes stériles et portées au laboratoire où avaient lieu les ensemencements. Les milieux les plus usuels étaient le milieu de Conradi-Drigalsky et la gélatine. En effet, en suivant le procédé de Choutkevitch (8), employé couramment par Metchnikoff, il est très aisé d'isoler le *Bacillus Proteus vulgaris*, même quand il existe en faible quantité. On ensemence un tube de gélatine avec un peu de matières, on porte à l'étuve à 22 degrés, et un jour après le milieu présente une liquéfaction en doigt de gant sous l'influence de cette bactérie, qui est très protéolytique. Comme parfois il existe du staphylocoque ou d'autres microbes liquéfiant la gélatine, on prend une anse de platine de ce milieu liquéfié et on le porte dans l'eau de condensation d'un tube de gélose inclinée. Si cette liquéfaction est due au *Bacillus Proteus vulgaris*, très rapidement celui-ci envahit la surface du milieu et, à la partie supérieure du tube, on obtient, en vingt-quatre heures, une culture pure de cette bactérie.

Il est très important, pour ces recherches, d'employer cette méthode, car, assez souvent, alors que j'avais isolé de cette façon le *Proteus vulgaris* existant dans une selle, je n'en trouvais aucune colonie sur le milieu de Conradi-Drigalsky.

Aussitôt les ensemencements faits de la façon que je viens de décrire, je prenais la réaction des matières fécales. Dans trente-deux cas, la réaction, prise avec du papier de tournesol neutre, fut neutre; dans dix-neuf cas, elle fut légèrement acide, et enfin, dans quatre cas, alcaline.

Une parcelle de ces matières était ensuite diluée avec une goutte d'eau sur une lame, puis colorée par la méthode de Gram-Nicolle. Dans tous ces cas, la prédominance de la flore ne prenant pas le Gram était très marquée, toujours dans la

proportion de $\frac{4}{1}$ à $\frac{6}{1}$, et, parmi ces espèces colorées par la fuchsine de Ziehl diluée, à côté d'un certain nombre de formes cocco-bacillaires, la plus grande partie était souvent formée de bacilles de taille variable, rappelant le *Bacillus Proteus vulgaris*. Un fait intéressant à noter est que, dans toutes ces préparations, le *Bacillus Bifidus* avait presque complètement disparu.

Aucun des enfants malades n'était nourri au lait de femme; tous les plus jeunes, c'est-à-dire de un à quatre mois, prenaient du lait de vache; les autres, de huit à douze mois, avaient fréquemment un régime mixte, farines lactées et lait de vache.

Dans aucun cas, je n'ai pu faire l'ensemencement du sang des petits malades, la quantité à retirer étant beaucoup trop considérable pour des enfants affaiblis. En outre, comme aucun des cas traités dans les hôpitaux ne fut mortel, la recherche fut impossible dans les organes.

Jusqu'à présent, tous les essais d'agglutination faits avec le sang des enfants atteints de choléra infantile vis-à-vis des différents microbes trouvés dans leurs selles et considérés à tour de rôle, comme jouant un rôle dans l'étiologie de cette maladie par les différents auteurs qui les avaient isolés, ont été négatifs. Seul, Morgan dit avoir obtenu trente fois l'agglutination avec son *bacillus Métacoli I*, qu'il pense être l'agent de cette diarrhée.

J'ai, dans les cas qui étaient, au point de vue clinique, les plus typiques de la diarrhée des nourrissons, cherché le pouvoir agglutinant du sérum vis-à-vis des différents micro-organismes que j'avais pu trouver dans ces cas. Le sang étant toujours pris par piqûre de l'oreille, je n'ai jamais pu obtenir, et encore très irrégulièrement, plus qu'une agglutination à $\frac{1}{20}$ avec le *Bacillus Proteus vulgaris*, et jamais le moindre pouvoir agglutinant vis-à-vis des autres bactéries.

Dans les cinquante-cinq cas que j'ai pu examiner, j'ai trouvé constamment, en plus ou moins grande abondance, le *Bacillus Proteus vulgaris* (Hauser). Chacune de ces selles, sauf quatre, montra, après vingt-quatre heures d'étuve à 22 degrés dans

la gélatine, une liquéfaction abondante du milieu, puis l'ensemencement fait en gélose de la façon décrite précédemment donnait, au bout de vingt-quatre heures à 37 degrés, une culture pure de cette bactérie à la partie supérieure de la gélose inclinée.

Dans les quatre autres cas, soit que le *Bacillus Proteus* fût moins abondant, soit qu'il appartînt à des races moins protéolytiques, ce qui se trouve quelquefois, la digestion de la gélatine ne se produisait que quarante-huit heures après l'ensemencement, pour donner d'ailleurs, dans les mêmes conditions, une culture pure du microbe.

A côté de ce *Bacillus Proteus vulgaris*, j'ai pu, dans trois cas seulement, isoler le *Bacillus Pyocyaneus* qui fut déjà trouvé par Baginsky et par certains autres auteurs, et que Poels décela très fréquemment dans la diarrhée des veaux, au point qu'il le considère comme l'agent de cette maladie.

Les ensemencements faits sur le milieu de Drigalsky-Conradi me permirent, dans quinze cas, de trouver des microbes n'attaquant pas le lactose, non mobiles ou ayant seulement des mouvements giratoires, et que leurs caractères permettaient de les rattacher au groupe des dysentériques.

Enfin, dans huit cas seulement, j'ai pu obtenir une culture de *Streptococcus intestinalis* (entérocoque), qui a parfois été considéré par certains auteurs comme un agent pathogène. Il semble bien, au contraire, être un hôte normal de la flore intestinale que l'on peut trouver dans tous les cas ou presque.

Ici, je ne l'ai cherché que sur le milieu de Drigalski quand il en existait quelques colonies. Quand on désire l'obtenir, le meilleur moyen est d'ensemencer un peu des matières dans du bouillon acide; le deuxième jour ou le troisième, on ne trouve plus dans ce milieu que cet entérocoque et les acidophiles. Plus tard, il disparaît pour laisser ces microbes acidophiles exister seuls dans la culture.

Je vais ici donner le tableau des malades observés, l'aspect des matières, leur réaction et les bactéries isolées à l'examen cultural.

D'abord celles à réaction plus ou moins acide au tournesol.

NOMS	AGE (en mois)	COULEUR	ASPECT	BACTÉRIES	RÉGIME
E. H.	2	verte.	liquide.	*Proteus.*	Lait de vache.
S. B.	3	verte.	liquide.	*Proteus.*	Lait de vache.
P. K.	4	verte.	liquide.	*Proteus.*	Lait de vache.
E. D.	8	verte.	liquide.	*Proteus.*	Lait de vache.
F.	4	verte.	liquide.	*Proteus.*	Lait de vache.
S.	8	jaune et verte.	liquide.	*Pr.* entérocoque.	Lait de vache.
W. M.	8	verte.	liquide.	*Proteus.*	Lait, far. lact.
H. M.	3	verte.	liquide.	*Proteus.*	Lait.
W. F.	4	verte.	liquide.	*Pr.* entérocoque.	Lait.
S.	4	verte.	liquide.	*Proteus.*	Lait.
W. M.	5	verdâtre.	semi-fluide.	*Proteus.*	Lait.
H. G.	9	blanc-verdâtre.	semi fluide.	*Pr.* entérocoque.	Lait, far. lact.
W. C.	9	jaune et verte.	liquide.	*Proteus.*	Lait, far. lact.
W. K.	7	verte.	semi-fluide.	*Pr.* entérocoque.	Lait.
W. C.	9	verte.	liquide.	*Pr.* entérocoque.	Lait.
S. F.	4	jaune et verte.	semi-fluide.	*Proteus.*	Lait, far. lact.
E. N.	16	blanc-verdâtre.	liquide.	*Proteus.*	Lait.
W. S.	4	verte.	liquide.	*Pr.* entérocoque.	Lait.
G. S.	7	verte.	semi-fluide.	*Proteus.*	Lait.

Voici ensuite le tableau des différents malades dont les matières avaient une réaction neutre, c'était la majorité des cas.

NOMS	AGE (en mois)	COULEUR	ASPECT	BACTÉRIES	RÉGIME
H. C.	4	grise et verte.	semi-fluide.	*Pr.*, dysentér.	Lait.
S. W.	3	blanc-verdâtre.	liquide.	*Proteus.*	Lait.
E. K.	2	gris-verdâtre.	liquide.	*Proteus.*	Lait.
V.	8	gris-verdâtre.	semi-fluide.	*Pr.*, entérocoque.	Lait, far. lact.
W. B.	12	verte.	liquide.	*Pr.*, dysentér.	Lait, far. lact.
A.	5	gris-verdâtre.	semi-fluide.	*Pr.*, dysentér.	Lait.
O.	6	verte.	liquide.	*Pr.*, entérocoque.	Lait.
A. S.	6	gris-verdâtre.	semi-fluide.	*Proteus.*	Lait.
H.	4 1/2	verte.	liquide.	*Proteus.*	Lait.
B.	5 1/2	blanc-verdâtre.	semi-fluide.	*Proteus.*	Lait.
D. C.	5	verte.	liquide.	*Pr.*, dysentér.	Lait.
J. C.	11	blanc-verdâtre.	semi-fluide.	*Proteus.*	Lait. far. lact.
S.	3	verte.	liquide.	*Pr.*, dysentér.	Lait.
M.	5	verte.	liquide.	*Proteus.*	Lait.
F.	11	blanc-verdâtre.	liquide.	*Pr.*, dysentér.	Lait, far. lact.
P. B.	4	verte.	liquide.	*Pr.*, pyocyan.	Lait.
E. W.	2	verte.	liquide.	*Proteus.*	Lait.
W. C.	9	blanc-verdâtre.	semi-fluide.	*Proteus.*	Lait. far. lact.
S. L.	10	grise et verte.	liquide.	*Pr.*, dysentér.	Lait, far. lact.
E. W.	4	jaune et verte.	liquide.	*Pr.*, dysentér.	Lait.
J. B.	5	verte.	liquide.	*Proteus.*	Lait.
A. O.	10	verte.	liquide.	*Pr.*, dysentér.	Lait, far. lact.
V. P.	5	verte.	semi-fluide.	*Proteus.*	Lait.
I. R.	5	blanc-verdâtre.	semi-fluide.	*Pr.*, dysentér.	Lait.
J. K.	11	verte.	liquide.	*Pr.*, pyocyan.	Lait, far. lact.
W. W.	2	verte.	liquide.	*Pr.*, dysentér.	Lait.
W. K.	6	gris-verdâtre.	liquide.	*Proteus.*	Lait.
J. N.	3	verte.	liquide.	*Proteus.*	Lait.
A. B.	4	gris-verdâtre.	liquide.	*Pr.*, dysentér.	Lait.
W. S.	4 1/2	verte.	liquide.	*Pr.*, dysentér.	Lait.
W.	3	verte.	liquide	*Proteus.*	Lait.
G. H.	5	blanc-verdâtre.	Semi-fluide.	*Pr.*, dysentér.	Lait.

Maintenant voici les quelques cas ayant une réaction nettement alcaline.

NOMS	AGE	COULEUR	ASPECT	BACTÉRIES	RÉGIME
W. H.	7 semaines.	verte.	liquide.	*Proteus*, pyocyanique.	Lait.
W.	7 mois.	blanc-verdâtre.	semi-fluide.	*Proteus*.	Lait.
N.	11 mois.	blanc-verdâtre.	liquide.	*Proteus*, pyocyanique, dysentérique.	Lait, farine lactée.
J. K.	6 mois.	verte.	liquide.	*Proteus*, pyocyanique.	Lait.

Voici relatées quelques-unes des observations les plus typiques :

I. — S. B..., âgé de trois mois, entre à l'hôpital à la fin de juillet 1912. Depuis plus d'une semaine, il est pris de diarrhée profuse qui n'a pas été améliorée par la diète hydrique, il a une très légère augmentation de la température. Au moment où je l'examine à l'hôpital, l'enfant est absolument prostré dans son lit, les yeux sont excavés et les extrémités froides et cyanosées, le ventre est mou et flasque, la peau a complètement perdu son élasticité ; le pouls s'est ralenti à 58 pulsations par minute. L'examen des matières fécales montre une réaction très légèrement acide au tournesol et la présence du *Bacillus Proteus* en très grande abondance. Malgré la faiblesse du sujet, par piqûre de l'oreille je pris un peu de sang afin d'essayer l'agglutination, qui fut négative.

II. — J. K..., âgé de sept mois. Le tableau clinique était assez semblable au précédent, mais avec des phénomènes moins graves ; néanmoins l'algidité est très marquée, le nez effilé et cyanosé, même disparition de l'élasticité de la peau. Les selles liquides ont une réaction alcaline au tournesol, les ensemencements montrent la présence du *Bacillus Proteus* et du *Bacillus Pyocyaneus*. Les essais d'agglutination donnèrent un résultat positif à 1/20 avec le *Proteus*, négatif avec le pyocyanique.

III. — W. C..., neuf mois. Cet enfant, nourri de lait de vache et de farine lactée, a été pris assez brusquement de vomissements alimentaires qui n'ont pas cessé avec le citrate de sodium. Le pouls est à 95, la température s'élève à 39 degrés. Les selles semi-liquides, de réaction légèrement acide, provoquent des douleurs vives à l'émission, qui est fréquente. L'enfant est très agité. L'examen des cultures montre la présence du *Bacillus Proteus* et de nombreux *Streptococcus intestinalis*. L'agglutination fut négative avec les deux bactéries.

IV. — S. L..., âgée de dix mois, nourrie de lait et de farine lactée. Depuis déjà deux semaines avant son entrée à l'hôpital, elle présenta des alternatives

de diarrhée et de constipation avec des vomissements fréquents et manque d'appétit. L'enfant est pâle, le visage maigre, elle est indifférente à tout. Le ventre est mou, flasque, et à la palpation on entend des gargouillements tout le long du gros intestin.

Les selles sont très diarrhéiques, grises, striées de vert; la réaction en est neutre au papier de tournesol. J'ai isolé, dans ce cas encore, le *Bacillus Proteus* et un dysentériforme. L'agglutination fut négative.

En même temps que je me livrais à ces recherches sur la flore des enfants atteints de la diarrhée des nourrissons, je me suis procuré dans les différents services des hôpitaux, ou bien dans les consultations, des matières fécales d'enfants atteints d'autres affections que celles du tube digestif : bronchopneumonies, eczémas, infections à staphylocoques, tuberculose osseuse, tuberculose pleuro-péritonéale, paralysies, etc., en tout 24 cas.

Naturellement le matériel était prélevé de la même façon que dans les cas de diarrhée et ensemencé sur les mêmes milieux. Ici, fréquemment la flore ne prenant pas le Gram était très réduite; à première vue, les formes violettes étaient de beaucoup prédominantes. La réaction était généralement neutre dans 18 cas et dans 6 légèrement acide.

Dans ces 24 cas, il n'y eut que deux fois où je pus isoler le *Bacillus Proteus vulgaris*, et l'un de ces deux cas était un enfant qui, trois semaines auparavant, pendant les chaudes journées de juillet, avait été atteint du choléra infantile et qui, au moment où je l'examinai, n'avait plus aucun trouble du tube digestif mais venait à l'hôpital pour de l'impétigo.

Les autres bactéries isolées furent le *Streptococcus fæcalis* dans 11 cas, le *Bacillus pyocyaneus* dans 1 cas, et dans 4 cas les mêmes microbes du groupe dysentérique que j'ai déjà signalés dans la diarrhée. L'examen direct montrait manifestement, dans 18 de ces cas, la présence du *Bacillus bifidus*, qui avait presque ou même complètement disparu au cours de la diarrhée.

Naturellement, j'avais eu soin de prendre des échantillons de matières d'enfants qui avaient le même âge que ceux atteints du choléra infantile, c'est-à-dire entre un mois et un an.

NOMS	AGE (en mois)	MALADIE	RÉACTION	BACTÉRIES	RÉGIME
H. W.	7	Tuber. osseuse.	neutre.	*Streptococcus fæcalis.*	Lait.
T.	12	Eczéma.	neutre.	*Bifidus.*	Lait, far. lac.
D.	12	Dyspepsie.	neutre.	Dysentérique.	Lait, far. lac.
A.	2	Broncho-pneum.	neutre.	*Bifidus.*	Lait.
J. S.	10	Broncho-pneum.	lég. acide.	Streptocoque, *bifidus.*	Lait.
E. W.	9	Tuber. osseuse.	neutre.	*Bifidus.*	Lait.
W. W.	7	Pneumonie.	lég acide.	*Bifidus.*	Lait.
R. K.	7	Bronchite.	neutre.	*Bifidus*, streptocoque.	Lait.
W. C.	9	Broncho-pneum.	neutre.	Dysentérique.	Lait.
J. F.	10	Maladie de Little.	neutre.	Streptocoque.	Lait, far. lac.
W. H.	11	Staphylococcie.	lég. acide.	Streptocoque, *bifidus.*	Lait, far. lac.
H. C.	8 1/2	Paralysie.	neutre.	*Bifidus.*	Lait.
S. K.	11	Impétigo.	neutre.	*Proteus.*	Lait, far. lac.
G. M	9	Broncho-pneum.	neutre.	Dysentérique.	Lait.
R. N.	9	Staphylococcie.	lég. acide.	Streptocoque, *bifidus.*	Lait, far. lac.
W.	11	Broncho-pneum.	neutre.	*Proteus.*	Lait, far. lac.
C. S.	8	Syphilis.	lég. acide.	Streptocoque, *bifidus*	Lait.
J. S.	12	Pneumonie.	neutre.	Streptocoque, *bifidus.*	Lait, far. lac.
E. C.	6	Paralysie.	neutre.	Streptocoque, *bifidus.*	Lait.
D. H.	8	Broncho-pneum.	neutre.	*Bifidus.*	Lait.
B. S.	12	Conjonctivite.	neutre.	Streptocoque.	Lait, far. lac.
W.	10	Eczéma.	lég. acide.	*Bifidus.*	Lait.
A. R.	9	Pneumonie.	neutre.	Pyocyanique dysenté.	Lait.
E. W.	6	Paralysie.	neutre.	Streptocoque, *bifidus.*	Lait.

Conclusions.

Dans 55 cas de diarrhée infantile examinés à Londres, en juillet et août 1912, il me fut possible de trouver 55 fois le *Bacillus Proteus vulgaris* (Hauser), alors que les autres bactéries considérées à tour de rôle par les différents auteurs comme l'agent causal de cette maladie ne furent isolées que très rarement : 3 fois pour le pyocyanique, 15 fois pour des dysentériformes et 8 fois pour l'entérocoque, les paratyphiques étant toujours absents. Le *B. metacoli* de Morgan ne fut pas isolé, car les quelques bactéries n'attaquant pas le lactose rentraient, ainsi que je l'ai dit déjà, dans le groupe des dysentériques ; ils n'avaient pas la grande mobilité du bacille de Morgan.

Au contraire, dans la flore intestinale de 24 enfants qui, au point de vue du tube digestif, pouvaient être considérés comme parfaitement sains, je n'ai obtenu le *Bacillus Proteus* que dans deux cas, le *Bacillus pyocyaneus* dans un seul, et quatre fois des dysentériformes, l'entérocoque étant plus fréquent que dans les selles pathologiques. Ces résultats diffèrent

sensiblement de ceux obtenus par Bahr (9), à Copenhague, au cours des recherches qu'il fit en 1910 et 1911.

Peut-on dire que ces différents microbes soient les causes de l'infection ? Il semble vraisemblable qu'à l'état pur ils ne produisent qu'une action faible ou nulle, ainsi qu'ont pu le montrer les différents essais d'infestation expérimentale, sauf les cas de Morgan et Ledingham qui ont pu donner la diarrhée à quelques animaux de laboratoire. Metchnikoff (10), dans ses essais sur le choléra expérimental, avait montré l'importance de la flore favorisante. A. Berthelot (11) récemment a jeté un jour nouveau sur la question. Dans un milieu aussi complexe que l'intestin, où les espèces microbiennes sont très abondantes, il était fort vraisemblable que ces bactéries, ou au moins certaines d'entre elles, pouvaient, dans une véritable symbiose, agir comme agents infectants.

Ses expériences avec le *Bacillus Proteus vulgaris* isolé de différents cas de diarrhée infantile, incapable à lui seul de déterminer une diarrhée chez des rats blancs, ont montré que si on lui adjoint le *Bacillus aminophilus intestinalis* (12) isolé de cas de colites muqueuses à selles acides, très rapidement les animaux sont pris de diarrhée muqueuse, les matières sont très acides et des phénomènes graves apparaissent entraînant rapidement la mort.

Il est très regrettable que je n'aie pas porté mon attention sur les microbes du groupe du *Bacillus aminophilus intestinalis* très voisin du *Bacillus lactis aerogenes*, qui est assez fréquemment trouvé dans les selles des nourrissons et que l'on devrait étudier avec plus de soin, désormais, à cause de son rôle possible en symbiose avec le *Proteus* dans le choléra infantile.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Booker, *Transactions internat. Medical Congress*, Washington, 1887, p. 598. *John Hopkins Hospital Reports*, 1897, VI, p. 159.

(2) Wollstein, *J. of med. research.*, Boston, 1903.— Pack, Collins et Goodwin, *New York Path. Society*, vol. III, 1903, p. 148. — Duval et Shorer. *Ibid.*, 1903, vol. III, p. 144.

(3) Poels, *Rapport over de Kalverziekte in Nederland*. Gravenhage, 1899.

(4) Morgan, *British medical Journal*, vol. I, 1906, p. 908, et vol. II, 1907, p. 10.

(5) Morgan et Ledingham, *Proceedings Royal Soc. Medecine*, mars 1909.

(6) Metchnikoff, *Bulletin de l'Acad. de Médecine*, t. LXII, 1909.

(7) Nobécourt, *Précis de maladies infantiles*. Masson, 1911.

(8) Choutkevitch, *Annales de l'Institut Pasteur*, mars-avril, 1911.

(9) L. Bahr, *Centralbl. f. Bakt.*, 1. Abt. Orig. Bd LXVI, 12 octobre 1912, p. 335. — L. Bahr et Thomsen, *Centralb. f. Bakt.*, 1 Abt. Orig. Bd. LXVI, 12 octobre 1912, p. 365.

(10) Metchnikoff, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1894.

(11) A. Berthelot, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 18 mai 1913. *Thèse de la Faculté de Médecine*, 1913.

(12) A. Berthelot et D.-M. Bertrand, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 10 juin et 24 juin 1912. — *Lancet*, février 1913.

RECHERCHES SUR LA FLORE INTESTINALE

NOUVELLES

DONNÉES EXPÉRIMENTALES SUR LE ROLE PATHOGÈNE

DE CERTAINES ASSOCIATIONS MICROBIENNES

par Albert BERTHELOT.

(Laboratoire de M. Metchnikoff.)

Si l'on veut que les recherches sur la flore intestinale, considérée comme facteur d'infection ou d'auto-intoxication, aient quelques chances d'aboutir à un résultat utile, il est indispensable d'avoir sans cesse présente à l'esprit l'extrême diversité des espèces qui la constituent. On évite ainsi de s'attarder trop longtemps à l'étude individuelle de celles-ci, et l'on est amené, au contraire, à examiner avec soin les nombreuses symbioses qu'elles permettent de réaliser.

De plus, dans l'étude même de ces associations microbiennes au point de vue de leur action pathogène, il ne faut pas seulement envisager les propriétés toxiques des cultures symbiotiques obtenues *in vitro*, et il est nécessaire de déterminer quels sont les effets produits chez l'animal par l'ensemencement massif du tube digestif avec les microbes considérés. Mieux encore, ces effets doivent être étudiés sur des animaux soumis à une alimentation convenablement choisie, d'après les propriétés biochimiques particulières aux espèces qui composent l'association bactérienne utilisée.

Pour montrer la nécessité d'une telle méthode dans l'étude de la flore intestinale, je pourrais m'appuyer sur des considérations théoriques se prêtant à de longs développements, mais comme, à cet égard, rien ne vaut les faits, je préfère m'en tenir au simple exposé de ce que j'ai eu l'occasion d'observer en étudiant la symbiose du *Proteus vulgaris* et du *Bacillus aminophilus intestinalis*.

Tout d'abord, je dois rappeler qu'en collaboration avec M. D.-M. Bertrand (1), nous avons isolé cette dernière bactérie, des matières fécales acides d'un sujet atteint de troubles intestinaux persistants. Pour cet isolement, nous avions employé la méthode générale que j'ai préconisée (2) pour séparer facilement certaines espèces de la flore intestinale, que j'ai qualifiées d'acidaminolytiques, parce qu'elles présentent une affinité spéciale à l'égard des acides aminés.

En étudiant ce microbe, nous avons constaté qu'il appartient au même groupe que le pneumobacille et le *B. lactis aerogenes*; il est très voisin de ce dernier, possède à peu près les mêmes propriétés saccharolytiques et acidogènes, mais il s'en distingue par quelques points de sa morphologie, l'agglutination, et surtout l'énergie avec laquelle il attaque les aminoïques, aux dépens desquels il donne, suivant les aliments qui sont à sa disposition, des produits très variés, parmi lesquels se trouvent notamment des amines toxiques.

Le *B. aminophilus intestinalis* est, en somme, un microbe voisin du *B. lactis aerogenes*, capable de produire dans l'intestin soit d'assez grandes quantités d'acides où domine l'acide lactique, soit une proportion notable de ptomaïnes, dont certaines, comme l'imidazoléthylamine, présentent une très grande toxicité. Cette production d'acide lactique et d'amines nocives peut d'ailleurs être simultanée; dès le début de nos recherches, nous avons vu que le *B. aminophilus* peut donner de l'imidazoléthylamine dans un milieu à base d'histidine non sucré et contenant une faible proportion d'acide lactique (3), mais, depuis que nous avons publié ce fait, nous avons isolé

(1) Albert Berthelot et D.-M. Bertrand, Recherches sur la flore intestinale. Isolement d'un microbe capable de produire de l'imidazoléthylamine aux dépens de l'histidine. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 10 juin 1912, t. CLIV, p. 1643.

Albert Berthelot et D.-M. Bertrand, Sur quelques propriétés biochimiques du *Bacillus aminophilus intestinalis*. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 24 juin 1912, t. CLIV, p. 1826.

(2) Albert Berthelot, Recherches sur la flore intestinale. Isolement des microbes qui attaquent spécialement les produits ultimes de la digestion des protéiques. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 24 juillet 1911, t. CLIII, p. 306.

(3) Albert Berthelot et D.-M. Bertrand, Sur la production possible des ptomaïnes en milieux acides. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 31 mars 1913, t. CLVI, p. 1027.

une race du même microbe qui peut, dans une solution nutritive renfermant cette fois du glucose et de l'histidine, produire en même temps de l'acide lactique et de l'imidazoléthylamine.

C'est en considérant les propriétés biochimiques du *Proteus* et du *B. aminophilus* que l'idée m'est venue d'étudier leur symbiose. Je me suis tout d'abord demandé si, en ensemençant du lait avec le *Proteus*, puis en faisant intervenir le *Bacillus aminophilus* dès le début de la protéolyse, il n'y aurait pas formation de bases toxiques par décarboxylation des acides aminés mis en liberté par l'hydrolyse microbienne de la caséine. Je me rendais bien compte qu'il y avait peu de chances pour qu'il en soit ainsi, étant donné le pouvoir désaminant du premier et l'activité acidogène du second de ces microbes; mais, malgré cela, j'ai tenté quelques expériences.

J'ai ensemencé deux ballons de lait stérilisé avec un *Proteus* isolé d'une diarrhée infantile, puis, après quarante-huit heures de séjour à 37 degrés, alors que l'attaque du caséum était à peine commencée, j'ai introduit dans l'un des ballons une forte dose de jeunes corps microbiens de *B. aminophilus*. J'ai replacé les deux ballons à l'étuve et, au bout de huit jours, j'ai centrifugé les deux cultures, filtré sur bougie Chamberland les parties liquides et comparé leurs toxicités pour le cobaye. J'ai constaté que le filtrat obtenu avec la culture de *Proteus* seul était notablement plus toxique que celui préparé avec la culture mixte.

En présence de ce résultat, je fis alors l'expérience suivante : j'ensemençai avec du *Proteus*, du *B. aminophilus* ou un mélange des deux microbes, des ballons renfermant, les uns une solution de peptone pancréatique de caséine, les autres la même solution additionnée de 4 p. 100 de lactose ou de glucose. Cette fois encore, les cultures furent filtrées au bout de huit jours et les filtrats éprouvés sur des cobayes. Dans ces conditions, j'ai observé que les cultures de *B. aminophilus*, que le milieu soit sucré ou non, ne présentaient qu'une toxicité pratiquement insignifiante; les cultures de *Proteus* avaient leur toxicité habituelle dans l'eau peptonée simple ou lactosée et une toxicité négligeable avec le milieu glucosé; les cultures mixtes obtenues avec l'eau peptonée simple présentaient exactement la même toxicité que celles du *Proteus* seul, tandis que les cultures réalisées en présence de lactose ou de glucose étaient

pratiquement sans influence nocive sur les cobayes. Enfin j'ai constaté que, sur les milieux solides non sucrés, les deux microbes se développent à côté l'un de l'autre sans qu'il se manifeste une action empêchante ou favorisante quelconque.

Si je m'en étais tenu aux résultats de ces expériences *in vitro*, j'aurais dû conclure que, dans l'intestin, le *B. aminophilus*, toutes les fois qu'il a des sucres à sa disposition, doit se comporter comme un véritable ferment lactique et jouer, par conséquent, un rôle bienfaisant en gênant les microbes protéolytiques, mais en expérimentant *in vivo*, j'ai pu rapidement me convaincre combien il aurait été imprudent d'adopter de telles conclusions.

En effet, si l'on nourrit de gros rats blancs exclusivement avec du lait stérilisé, partiellement coagulé par la présure, et qu'avec cet unique aliment on administre, chaque jour, à certains d'entre eux, une quantité de *Proteus* ou de *B. aminophilus* correspondant à une demi-culture sur gélose, à d'autres la quantité équivalente d'un mélange à parties égales des deux microbes, on peut faire une série de constatations dont voici les principales (1) :

1° Le *Proteus* seul, même à ces fortes doses, est sans influence apparente sur les rats, ce qui n'est guère étonnant d'ailleurs, puisque ce microbe est l'hôte habituel de leur intestin.

2° La plupart des animaux qui ne reçoivent que du *B. aminophilus* n'en souffrent pas et se maintiennent à peu près à leur poids primitif; cependant, quelques-uns d'entre eux, et ce sont toujours les plus jeunes, succombent après un délai de huit à dix jours.

3° Tous les rats qui absorbent à la fois les deux microbes présentent au bout de six à huit jours une diarrhée très accentuée; les matières qu'ils expulsent sont riches en mucus filant et très acides. Ces animaux maigrissent rapidement et, presque tous, finissent par succomber du dixième au vingtième jour.

4° Si l'on donne à des rats du lait auquel on ajoute une assez forte proportion de caséine sèche, ou, mieux encore, si l'on

(1) Albert Berthelot, Recherches sur la flore intestinale. Sur l'action pathogène d'une association microbienne : *Proteus vulgaris* et *Bacillus aminophilus intestinalis*. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CLVI, 19 mai 1913, p. 1567.

augmente la dose journalière du mélange de microbes, on observe que les animaux meurent très vite, en quatre à huit jours; la phase de diarrhée muqueuse et acide est alors extrêmement réduite, et la mort est déterminée par une entérite aiguë à forme hémorragique.

Les expériences qui m'ont permis d'établir ces faits ont porté sur 150 rats. Je n'en donnerai pas ici la relation détaillée, car je l'ai publiée récemment dans un travail d'ensemble sur le *Proteus vulgaris* (1); toutefois, il me semble indispensable de rapporter les observations que j'ai faites en autopsiant les animaux morts au cours de mes essais; en voici l'exposé sommaire :

1° *Rats ayant présenté pendant au moins six jours une diarrhée muqueuse et acide.* — Foie et reins pâles; intestin et surrénales congestionnés. L'intestin grêle, souvent distendu par des gaz, contenait des flocons de caséine incomplètement attaquée mêlés à du mucus; celui-ci, très abondant, était visqueux, filant et acide. Le cæcum était rempli d'une bouillie grisâtre très acide. En ouvrant l'intestin grêle et le cæcum et en lavant la muqueuse, on voyait de place en place de petites ponctuations hémorragiques. Dans les autopsies faites alors que le cadavre était encore chaud, on ne trouvait le *Proteus*, dans le sang du cœur, que quatre fois sur dix.

2° *Rats ayant succombé dès les trois premiers jours de la diarrhée acide.* — Hyperémie marquée de tous les organes abdominaux. Grosse rate; gros intestin rempli de matières grisâtres riches en mucus, mais beaucoup moins acides que dans le cas des rats malades depuis longtemps; intestin grêle parfois distendu et très congestionné par places, mais le plus souvent formant une masse dans laquelle il était très difficile d'isoler les anses intestinales agglutinées entre elles et remplies tantôt d'une matière visqueuse et brunâtre, tantôt de caséine incomplètement attaquée mêlée à du mucus. A l'ouverture de l'intestin, dans certaines anses grêles, la muqueuse se détachait en lambeaux grisâtres, dans d'autres on trouvait des placards ecchymotiques; la muqueuse cæcale présentait souvent

(1) Albert Berthelot, Recherches sur quelques caractères du *Proteus vulgaris*. *Thèse de Médecine*). Paris, 1913.

un piqueté brunâtre qui paraissait être de nature hémorragique. Dans le sang du cœur, présence du *Proteus* sept fois sur dix.

3° *Rats ayant succombé très rapidement, parfois après avoir présenté une courte période de diarrhée.* — Intestin grêle agglutiné en une masse informe, de laquelle il est très difficile d'isoler les anses qui sont remplies d'une matière noirâtre, visqueuse, alcaline, plus ou moins fluide et d'odeur infecte. Cette matière était constituée par un mélange de mucus et de sang altéré; on la retrouvait dans le cæcum mêlée à de rares masses grisâtres. Les excréments contenus dans le reste du côlon affectaient parfois leur forme ovillée habituelle, mais le plus souvent ils étaient constitués par la même substance alcaline, visqueuse et noirâtre qui remplissait l'intestin grêle. Le foie, la rate, les reins et les surrénales étaient en général très congestionnés; les deux premiers de ces organes étaient même parfois noirâtres. A l'ouverture de l'intestin, mêmes observations que ci-dessus, mais avec phénomènes destructifs et hémorragiques incomparablement plus marqués. Dans le sang du cœur, présence du *Proteus* douze fois sur quinze. Je n'ai jamais pu déceler le *B. aminophilus* dans le sang des rats que j'ai autopsiés.

En un mot, il résulte bien de mes expériences que si l'on soumet des rats au régime lacté exclusif et à l'ingestion répétée d'un mélange de *Proteus vulgaris* et de *B. aminophilus intestinalis*, on provoque chez eux une entérite qui peut revêtir soit une forme subaiguë caractérisée par une diarrhée muqueuse et acide, soit une forme aiguë hémorragique rapidement mortelle.

Ce point étant bien établi, j'ai cherché s'il était possible d'entraver la marche des phénomènes entéritiques. Pour cela j'ai mis en expérience 4 lots de 6 rats; deux de ces lots A et B ont été traités de manière à déterminer la forme aiguë; les deux autres C et D ont été alimentés et infectés de façon à leur donner simplement la diarrhée caractéristique de la forme à évolution lente.

Au troisième jour du régime les animaux des lots A et B étaient déjà manifestement malades, j'ai cesssé de donner des microbes au lot B tout en continuant le régime lacté. Malgré cela tous les rats de ce lot sont morts entre le quatrième et le

neuvième jour : ceux du lot A ont tous succombé du quatrième au septième.

Pour les lots C et D j'ai attendu l'apparition de la diarrhée acide et muqueuse ; le lendemain du jour où je l'ai constatée chez tous les rats, c'est-à-dire le neuvième jour, j'ai supprimé les microbes au lot D, tout en continuant l'alimentation lactée. Les rats du lot témoin C ont commencé à succomber le onzième jour, tous étaient morts au vingt-deuxième ; sur les six animaux du lot D je n'ai pu en conserver qu'un seul qui s'est définitivement rétabli, les cinq autres ont succombé du dixième au vingt-septième jour.

J'ai alors répété cette expérience dans des conditions absolument identiques quant aux doses de microbes et au nombre d'animaux formant également quatre lots A′ B′ C′ et D′ ; mais au lieu de supprimer seulement les microbes aux lots B′ et D′ j'ai de plus remplacé le lait par le régime habituel des rats (carottes, pain et blé). Les résultats ont été les suivants :

1° Lots A′ et B′ : douze animaux en expérience sont morts du quatrième au huitième jour ; je n'ai observé aucun retard pour les rats du lot B′.

2° Lots C′ et D′ : Cinq des rats du lot C′ sont morts du douzième au vingtième jour : le sixième s'est complètement rétabli malgré l'absorption du lait et de microbes jusqu'au trentième jour. Sur les six animaux du lot D′ un seul est mort le douzième jour, tous les autres ont survécu.

En présence de ce fait, j'ai tenu à le vérifier sur un lot de 12 rats. J'ai donné à ces animaux du lait contaminé par les deux microbes de telle manière que la diarrhée a commencé à se manifester le sixième jour : le lendemain tous rejetaient des mucosités acides. Le huitième jour j'ai supprimé le lait ainsi que le mélange infectant et donné le régime végétarien habituel ; malgré cela deux rats sont morts le dixième jour ; c'étaient d'ailleurs les deux plus petits du lot et ils ne pesaient que 135 grammes. Tous les autres ont survécu ; quatre jours après la suppression du régime nocif la diarrhée avait disparu et les matières présentaient leur aspect normal.

Par un régime convenable, et en cessant de leur donner des microbes, on peut donc guérir les animaux présentant depuis un ou deux jours une diarrhée légère, mais on ne peut empê-

cher la mort des rats présentant les symptômes de début de la forme aiguë.

D'autre part j'ai constaté que la guérison des animaux légèrement malades peut être obtenue, sans qu'il soit nécessaire de cesser le régime infectant, à l'aide d'un vaccin préparé avec un mélange des deux microbes tués par l'éther.

Dans une première expérience portant sur un lot de dix gros rats présentant tous un début de diarrhée après cinq jours de régime, j'ai pratiqué trois injections sous-cutanées d'une émulsion microbienne traitée par l'éther, à la manière de Vincent, et correspondant à la dilution de deux cultures de *Proteus* et de deux cultures de *B. aminophilus* dans 80 cent. cubes d'eau physiologique. Ayant préalablement déterminé sur des rats de même poids la dose de vaccin qu'ils pourraient supporter, j'ai fait à chaque animal, le lendemain du début de la diarrhée, une première injection de 3 cent. cubes. Bien que j'aie continué à leur donner lait et microbes, dès le lendemain ils rendaient des matières moulées, mais un jour après la diarrhée reprenait peu intense, quoique persistante. Au onzième jour de l'expérience j'ai fait une seconde injection de 4 cent. cubes; vingt-quatre heures après la diarrhée s'atténuait; le lendemain ils expulsaient des matières encore molles, mais quatre jours après l'injection celles-ci avaient repris leur apparence normale. Craignant une rechute, le dix-septième jour j'ai encore injecté 4 cent. cubes de vaccin sans observer aucune modification dans l'état des animaux qui n'a plus cessé d'être excellent. A la fin du deuxième mois tous étaient encore vivants bien qu'ils n'aient pas cessé d'absorber tous les jours leur dose habituelle de lait et de microbes, tandis que les dix rats d'un lot témoin étaient tous morts avant le vingtième jour.

J'ai répété cette expérience dans des conditions identiques; les résultats ont été aussi bons, car il me semble ne pas avoir à tenir compte de la mort d'un des rats vaccinés survenue au trente-sixième jour, cet animal étant comme tous les autres guéri depuis longtemps de sa diarrhée. Son cadavre ayant été presque complètement dévoré, je n'ai pu établir les causes de sa mort.

Lorsqu'on intervient tout à fait au début de la forme subaiguë de l'entérite expérimentale, c'est-à-dire lorsque les

animaux ont la diarrhée depuis seulement un ou deux jours, le vaccin mixte possède donc une action curative incontestable; mais celle-ci ne se manifeste pas dans la forme aiguë ou lorsqu'on intervient trop tard dans la forme simplement diarrhéique. Toutefois, dans ce dernier cas un certain nombre des rats traités succombent quinze à vingt-cinq jours plus tard que les témoins.

Dans la forme aiguë hémorragique la vaccination précipite même la marche des accidents, absolument comme le font d'ailleurs de trop fortes doses de vaccin (6 cent. cubes) injectées au début de la diarrhée. Plusieurs expériences m'ont montré que dans l'infection intense la mort survient dans les vingt-quatre heures qui suivent l'injection vaccinante ; les doses trop fortes dans la forme légère font mourir les animaux trois ou quatre jours avant les témoins.

Si les conditions dans lesquelles le vaccin est utilisable comme moyen de traitement sont assez étroites, son action préventive se manifeste avec beaucoup plus de netteté. En effet, j'ai traité douze rats, d'un poids moyen de 170 grammes, par trois injections de 4, 5 et 6 cent. cubes d'émulsion microbienne ; les injections étant faites de huit jours en huit jours, j'ai pu, quatre jours après la dernière, soumettre impunément les animaux ainsi traités au régime qui donne à coup sûr l'entérite muqueuse. J'ai prolongé pendant deux mois l'influence du lait et des microbes ; pendant tout ce temps l'état général des rats vaccinés m'a toujours paru excellent et leurs matières n'ont pas cessé de présenter leur aspect normal, tandis que tous les animaux d'un lot témoin avaient succombé entre le dixième et le vingtième jour, après avoir présenté la diarrhée muqueuse et acide caractéristique.

Bien entendu, au cours de toutes ces expériences sur les rats, j'ai examiné les matières fécales au point de vue bactériologique ; toutefois j'ai négligé celles qui provenaient d'animaux succombant rapidement à la forme aiguë hémorragique et j'ai porté toute mon attention sur celles des animaux présentant la forme diarrhéique à évolution plus lente.

J'ai remarqué qu'au début de la diarrhée, les déjections blanc jaunâtre étaient peu acides ; quelquefois même les animaux avaient quelques selles neutres après en avoir eu de net-

tement acides. A partir du deuxième jour l'acidité allait sans cesse en augmentant pour atteindre en général son maximum vers le cinquième, en même temps que s'accroissait la teneur en mucus et que les selles devenaient plus fluides. A ce moment elles présentaient une odeur fade, extrêmement désagréable; elles conservaient ce caractère, ainsi que leur grande acidité et leur aspect glaireux, jusqu'à la mort de l'animal.

Parallèlement à ces modifications, j'ai observé dans les matières la prédominance croissante du *Proteus* et du *B. aminophilus*, puis la multiplication de deux bacilles prenant le Gram dont l'un ne tardait pas à devenir prépondérant. J'ai isolé ces deux microbes; le moins abondant était le *B. perfringens*, il n'était d'ailleurs pas absolument constant dans les selles très acides. L'autre, qui se développait admirablement dans le bouillon lactique, coagulait le lait sans modifier le caillot, acidifiait les milieux contenant du lactose, du saccharose, du galactose ou du glucose et ne donnait pas d'indol, était très vraisemblablement identique au *B. acidophilus* de Moro, car il en présentait également tous les caractères morphologiques et biologiques.

Au moment où les selles diarrhéiques étaient à leur maximum d'acidité et jusqu'à la mort ou à la guérison des animaux, la flore était presque uniquement constituée par le *Proteus*, le *B. aminophilus* et le *B. acidophilus* (1), ce dernier en très grande abondance.

Quant aux matières des rats normaux, ainsi que je l'ai déjà dit, j'y ai presque toujours trouvé le *Proteus vulgaris*, mais je n'y ai jamais rencontré le *B. aminophilus*. Les *Proteus* isolés chez des rats bien portants ne différaient en aucune façon du *Proteus* de diarrhée infantile que j'ai employé pour mes expériences. J'ai fait notamment une expérience sur un lot de dix rats que j'alimentais avec du lait infecté avec du *B. aminophilus* et un *Proteus* isolé par M. Metchnikoff dans les déjections de tout jeunes rats; les résultats que j'ai obtenus (diarrhée

(1) Dans les derniers jours de la maladie, le Bacille acidophile joue peut-être un rôle important qu'il sera nécessaire de préciser. Ce microbe a d'ailleurs été signalé, par Finkelstein, Escherich et Salge, comme très abondant dans les matières des nourrissons atteints de certaines gastro-entérites aiguës.

muqueuse et acide, mort en huit à treize jours) ont été ceux que m'auraient donnés mon *Proteus* d'origine infantile.

Enfin, j'ai complété mes expériences en recherchant si les matières contenues dans l'intestin des rats malades contenaient une quantité appréciable de substances toxiques. Pour cela j'épuisais la masse recueillie dans l'intestin par l'alcool à 90 degrés additionné de 1 cent. cube pour 100 d'acide chlorhydrique concentré ; j'évaporais à sec, au bain-marie, la liqueur alcoolique obtenue claire par centrifugation. Je reprenais par l'eau le résidu de cette évaporation, je faisais bouillir cette solution quelques instants avec du noir animal, je la filtrais et je la concentrais au bain-marie. Quand il ne restait plus que 2 ou 3 cent. cubes de liquide légèrement acide, je neutralisais exactement avec quelques gouttes d'une solution de carbonate de sodium à 5 p. 100 et je complétais à 10 cent. cubes avec de l'eau physiologique à 7,5 p. 1000. Comme j'opérais toujours sur le contenu intestinal de deux rats, je savais à quoi correspondait ce volume de liquide, que j'éprouvais en l'injectant dans la jugulaire de gros cobayes de 600 à 650 grammes.

Dans ces conditions, avec 5 cent. cubes de liqueur, j'ai constaté que l'extrait du contenu intestinal d'un rat bien portant alimenté avec du lait sans microbes était sans action nocive pour le cobaye ; lorsque l'extrait provenait d'un animal venant de succomber à la forme diarrhéique subaiguë les cobayes étaient malades, mais se rétablissaient vite et ne présentaient plus aucun signe d'intoxication une heure après l'injection. Avec la solution obtenue en traitant le contenu intestinal d'un rat venant de mourir après quatre jours du régime hyperazoté et très riche en microbes, j'ai noté, au contraire, une toxicité élevée. En effet, 5 cent. cubes d'extrait tuaient l'animal sur l'appareil à contention et 3 cent. cubes déterminaient sa mort en quatre ou cinq minutes avec dyspnée violente, contractions très fortes du diaphragme, péristaltisme exagéré, distension extrême des poumons et persistance des battements cardiaques quelques instants encore après la cessation des mouvements respiratoires.

Ces symptômes rappelant singulièrement ceux que l'on observe chez les cobayes succombant à l'injection intraveineuse de 1/2 milligramme d'imidazoléthylamine, il est bien

possible que la toxicité du contenu intestinal des rats profondéments infectés et intoxiqués soit due à cette même base. Celle-ci proviendrait tout naturellement de l'action du *B. aminophilus* sur l'histidine libérée par l'hydrolyse diastasique de la caséine alimentaire et de l'hémoglobine du sang des hémorragies intestinales.

En même temps que je faisais avec des rats blancs toutes les expériences que je viens de rapporter, j'ai fait quelques essais sur d'autres animaux. Avec les souris blanches il m'a été facile de reproduire les recherches que j'avais faites avec les rats, car elles toléraient bien le régime lacté et l'infection massive par le *B. aminophilus* ou le *Proteus*; avec le mélange des deux microbes elles avaient, comme les rats, une diarrhée acide et muqueuse, mais celle-ci était de peu de durée, car la mort survenait toujours avant le onzième jour; certaines souris succombaient même entre le cinquième et le septième jour après vingt-quatre heures de diarrhée.

J'ai également essayé de provoquer l'entérite chez des lapins et des singes (macaque, chimpanzé), mais je n'ai rien obtenu de bien net (1). Parmi les animaux avec lesquels j'ai expérimenté, il n'y a donc que les rats et les souris qui m'aient constamment donné des résultats permettant d'affirmer la nocivité de l'association du *Proteus vulgaris* et du *B. aminophilus* pour les sujets soumis au régime lacté exclusif.

Depuis que M. Metchnikoff, dans ses recherches sur le choléra (2), a montré l'importance du rôle des associations microbiennes en pathologie, bien des auteurs ont fait dans le même ordre d'idées des constatations très intéressantes; il y a quelques années, M. H. Vincent a montré notamment que le *Proteus* donne avec le bacille d'Eberth une symbiose particulièrement nocive (3). Malgré tous ces travaux, certains bactériologistes s'obstinent à considérer individuellement les nombreuses espèces

(1) Pour le détail de ces expériences voir : Recherches sur quelques caractères du *Proteus vulgaris*, *loc. cit.*, page 82.

(2) Metchnikoff, Recherches sur le choléra et les vibrions (4e mémoire). Sur l'immunité et la réceptivité vis-à-vis du choléra intestinal, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. VIII, 1894, p. 529.

(3) Vincent, Rôle pathogène du *Proteus* dans les infections alimentaires. Association microbienne protéo-typhique, *Bull. de l'Acad. de Médecine*, t. LXII, 3e série, 1909, p. 338.

de la flore intestinale et ne semblent pas avoir saisi l'intérêt qu'il y a d'étudier également l'action pathogène des cultures symbiotiques des microbes intestinaux, ainsi que les phénomènes morbides que l'on peut provoquer chez les animaux en réalisant, dans leur tube digestif, la prépondérance de ces mêmes symbioses. Les faits que je viens de rapporter contribueront peut-être à les convaincre. Pour ma part, je compte poursuivre mes recherches sur le rôle des associations microbiennes en utilisant beaucoup d'autres microbes, pris aussi bien dans la flore intestinale de l'homme que dans celle des jeunes animaux domestiques.

Ce n'est d'ailleurs pas seulement en précisant l'action pathogène des associations de deux ou plusieurs espèces, préalablement étudiées une à une, que l'on étendra nos connaissances sur le rôle de la flore intestinale, mais aussi en examinant avec soin leur action biochimique, ainsi que je l'ai déjà recommandé lors de mes premières recherches sur les microbes acidaminolytiques. Dans le cas particulier de la symbiose du *Proteus* avec le *B. aminophilus* il est même indispensable que j'entreprenne cette étude pour essayer d'expliquer le mécanisme des phénomènes pathologiques que j'ai observés, mécanisme à l'égard duquel je suis, pour le moment, réduit aux hypothèses.

En dehors des idées qu'elles suggèrent sur l'utilité de l'étude des associations bactériennes, les constatations que j'ai eu l'occasion de faire au cours de mes expériences se prêtent encore à des considérations intéressantes à divers autres points de vue.

Tout d'abord il me semble bon de rappeler le rôle très important que paraît jouer le *Proteus vulgaris* dans l'étiologie de certaines gastro-entérites des nourrissons, rôle entrevu par Booker (1), mais nettement établi par les recherches de M. Metchnikoff (2). Or, dans ces entérites, la flore intestinale renferme très fréquemment, à côté du *Proteus*, une forte proportion

(1) Booker, *Trans. of the Ninth Internat. Congr.*, 1887, t. III. A study of some bacteria in the fæces of infants affected with summer diarrhœa, *Trans. of the Amer. Pediat. Soc.*, 1889; même sujet ; *John Hopkins Hosp. Rep.*, t. IV, 1896-97, p. 159.

(2) Metchnikoff, Recherches sur les diarrhées des nourrissons, *Bull. de l'Acad. de Médecine*, t. LXII, 29 novembre 1909, p. 326.

de microbes voisins du *B. aminophilus* et appartenant comme lui au groupe du *B. lactis aerogenes*. On sait d'autre part, que dans ces affections, qui présentent des formes aiguës et subaiguës, les matières sont souvent riches en mucus et très acides; parfois aussi, dans ces mêmes diarrhées le lait est mal toléré, tandis qu'on retire grand avantage de la suppression de cet aliment.

Comme on le voit, *certaines* gastro-entérites des nourrissons présentent de nombreux points communs avec l'affection intestinale que détermine, chez le rat, le régime lacté exclusif et l'infection mixte du tube digestif par le *Proteus* et le *B. aminophilus intestinalis*. Je ne voudrais pas que l'on me fît dire que toutes les diarrhées muqueuses et acides des jeunes enfants sont dues à l'association du *Proteus* avec un microbe du genre *Lactis aerogenes*, car je n'ai jamais eu cette pensée. J'ai simplement voulu attirer l'attention sur la ressemblance évidente des formes d'entérite expérimentale que j'ai réalisées et *certaines* gastro-entérites infantiles, ressemblance qui me conduit à rechercher notamment si les unes et les autres ne sont pas déterminées par une même cause : l'association du *Proteus* avec le *B. aminophilus ou une espèce voisine*.

A ce propos il me paraît intéressant de signaler que j'ai justement utilisé pour toutes mes expériences un *Proteus* isolé par M. Metchnikoff des matières fécales d'un nourrisson mortellement atteint d'une gastro-entérite; ces matières étaient acides et avaient donné sur milieu de Drigalsky-Conradi de nombreuses colonies semblables à celles de *B. lactis aerogenes*.

Pour moi, dans les cas de diarrhée infantile *où il intervient*, le *Proteus* ne manifeste son action que grâce à la présence d'un ou de plusieurs microbes favorisants. Celui-ci ou ceux-ci doivent-ils nécessairement appartenir au groupe acidogène du Pneumobacille et du *Lactis aerogenes*? Je ne le pense pas, je suis persuadé, au contraire, qu'un grand nombre d'espèces microbiennes peuvent jouer ce rôle, particulièrement dans la catégorie des acidaminolytiques. Si je crois à l'importance de ces dernières, c'est parce que ce sont elles qui produisent dans notre intestin les poisons chimiques les plus actifs; les unes, qui sont en même temps saccharolytiques, déterminent vraisemblablement les diarrhées fortement acides et muqueuses,

tandis que les autres n'attaquant pas les sucres, conditionnent probablement les diarrhées alcalines (1).

Je ne m'arrêterai pas davantage aux nombreuses hypothèses que l'on pourrait faire dans cet ordre d'idées; il y a souvent bien loin de ce que nous observons *in vitro* à ce qui se passe dans l'intestin et, dans l'interprétation des faits qui m'occupent, il serait singulièrement imprudent d'oublier la part importante qui doit revenir aux phénomènes digestifs et aux défenses de l'organisme.

Quels que soient la nature et le mode d'action des microbes dont l'on établira les propriétés favorisantes, on peut déjà, dans ce que j'ai observé, trouver quelques indications sur la pathogénie probable des gastro-entérites à *Proteus*. Il doit y avoir, en effet, des nourrissons porteurs de ce microbe, qui restent bien portants jusqu'au moment où ils sont infectés par une espèce favorisante; il doit y avoir également, des enfants dont la flore comporte les éléments d'une association pathogène et qui ne présentent des symptômes entéritiques que le jour où la composition chimique de leur milieu intestinal se trouve profondément modifiée, soit par des troubles fonctionnels des glandes digestives, soit par un changement de régime (par exemple : remplacement du lait maternel par le lait de vache). Enfin, quand on se souvient de l'influence que possèdent sur l'évolution de l'entérite expérimentale les variations de la dose de bactéries infectantes, l'on ne peut s'étonner de voir les nourrissons contracter les formes graves de gastro-entérite pendant la saison chaude, c'est-à-dire lorsque le lait contient la plus forte proportion de microbes.

Si artificielles que soient les conditions dans lesquelles je l'ai réalisée, l'entérite expérimentale du rat n'est pas seulement intéressante à cause de sa ressemblance avec *certaines*

(1) Il ne faut pas oublier cependant, que la désamination microbienne des molécules aminoïques fournit des acides, qui interviennent peut-être pour une part notable dans la genèse des phénomènes pathogènes attribués aux acides provenant de l'attaque des hydrates de carbone.

Je répète que par microbes acidaminolytiques j'entends ceux pour lesquels les acides aminés constituent de véritables aliments d'élection; certains de ces microbes manifestent même pour tel ou tel aminoïque une affinité si grande qu'elle peut être considérée comme un caractère distinctif. C'est d'ailleurs sur ce fait qu'est basée la méthode d'étude de la flore intestinale que j'ai proposée en 1911 (*loc. cit.*).

entérites des nourrissons et des très jeunes animaux domestiques; elle l'est aussi, à un point de vue plus général, par les idées qu'elle suggère sur l'étiologie et la pathogénie de certaines affections de l'intestin. Elle montre, en effet, combien il importe, dans certains cas, de ne pas attribuer un état pathologique donné à un seul microbe, mais plutôt à l'action combinée d'une association microbienne et d'une alimentation défectueuse. Elle attire l'attention sur le rôle que doivent avoir les espèces acidaminolytiques dans la genèse de certaines infections du tube digestif, soit par elles-mêmes, soit surtout lorsqu'elles se trouvent associées à certaines espèces protéolytiques; au début de mes recherches sur les microbes de ce groupe, je ne voyais en eux que des facteurs importants d'auto-intoxication, mais depuis mes expériences avec le *B. aminophilus* et le *Proteus*, je suis persuadé que parfois ils sont aussi des facteurs directs ou indirects d'infection locale (1).

Enfin, l'entérite du rat, avec sa forme subaiguë à diarrhée muqueuse et acide, fait voir également l'intérêt qu'il y a d'étudier à part les entérites au cours desquelles les matières sont constamment acides; elles nous confirment, M. D.-M. Bertrand et moi, dans les idées que nous ont données, sur l'étiologie de certaines colites muqueuses persistantes, les recherches que nous poursuivons depuis plus de deux ans et qui nous ont déjà conduits à établir que la production de ptomaïnes par certains acidaminolytiques peut s'effectuer en milieu nettement acide.

Dans un autre ordre d'idées les résultats que j'ai obtenus avec un vaccin mixte me semblent aussi présenter quelque intérêt. Si sommaires qu'aient été mes expériences, il est incontestable, qu'au point de vue préventif, elles donnent le droit de penser qu'il sera peut-être possible de vacciner les nourrissons contre *certaines* gastro-entérites, dès que nos connaissances étiologiques seront un peu plus complètes.

Pour essayer de réaliser une telle vaccination, il est tout indiqué de faire d'abord, ainsi que je me le propose, de nom-

(1) Sans oublier bien entendu qu'ils peuvent être parfois des facteurs d'infection générale, comme un grand nombre d'autres microbes de l'intestin.

breux essais sur de très jeunes animaux domestiques, si sensibles, eux aussi, aux infections gastro-intestinales; ces essais devront porter, bien entendu, sur divers modes d'immunisation, mais auparavant il faudra préciser s'il est nécessaire que les vaccins soient mixtes ou s'il suffit, au contraire, d'utiliser un seul microbe : celui qui constitue l'élément virulent de l'association bactérienne dont on a établi le rôle pathogène.

Les faits que j'ai observés relativement à l'action curative des injections vaccinantes sont moins nets que les précédents; ils donnent néanmoins une base expérimentale à la vaccinothérapie des affections inflammatoires de l'intestin. Il y a un certain temps déjà que les médecins anglais, à la suite des travaux de Wright, traitent par des auto-vaccins certaines infections chroniques de l'intestin (1), mais chez nous on a généralement mis en doute les résultats qu'ils ont obtenus.

Mes expériences, en éliminant le facteur psychique auquel on attribue souvent les succès de la vaccinothérapie, restreindront, peut-être, le nombre des sceptiques, déjà diminué par les constatations faites récemment sur l'effet favorable des vaccins de Chantemesse, de Vincent ou de Besredka dans le traitement de la fièvre typhoïde. Elles montrent nettement en tout cas, qu'avec des vaccins appropriés, l'on peut essayer, si paradoxal que cela paraisse, de traiter avec des chances de succès *certaines* entérites; elles font même voir *combien il faut être prudent* dans les essais de ce genre, aussi bien au point de vue de l'opportunité même de la vaccination, qu'au sujet de la composition des vaccins et du choix de la dose à injecter.

30 juin 1913.

(1) R. W. Allen, *Vaccine therapy its theo y and practice*, p. 226, 4e édit., 1912. H. K. Lewis. Londres.

ESSAIS
DE STÉRILISATION DES SPORES CHARBONNEUSES

par Georges ABT

A la demande du Syndicat général des cuirs et peaux de France, j'ai étudié l'action de quelques antiseptiques sur les peaux charbonneuses, au point de vue de la stérilisation des spores et de la répercussion sur la valeur des peaux. Ces recherches ont été exposées ailleurs (1). Je voudrais seulement faire part ici d'expériences dont les résultats peuvent être utilisés pour d'autres problèmes de désinfection.

I

Résistance des spores a 100 degrés.

Pour apprécier la valeur d'un antiseptique, il faut le faire agir sur un test-objet dont la résistance relative soit connue. Pour la spore du charbon, le chauffage à 100 degrés m'a paru le moyen le plus simple et le mieux approprié de mesurer et de comparer les résistances des divers échantillons. C'est, d'ailleurs, le plus employé. Cependant, Krönig et Paul (2) ont préféré se servir d'une solution de sublimé à 1,69 p. 100 (n/16), et compter le nombre de germes survivants après un certain temps de contact. Ce procédé a le désavantage de conduire à une échelle de résistances très étendue, puisqu'on obtient pour trois minutes, par exemple, de 0 à 1000 colonies, sans qu'il soit facile d'apprécier la valeur des écarts. De plus, nous verrons que le sublimé est un mauvais critérium, parce que des facteurs trop instables interviennent dans la stérilisation apparemment obtenue.

Les auteurs allemands exposent généralement à un courant de vapeur à 100 degrés, sans pression, les spores séchées sur

des fils de soie. Dans ces conditions, von Esmarch (3) trouve des différences de une à douze minutes; les chiffres les plus fréquents sont deux et trois minutes. Dannapel (4), Otsuki (5) signalent des spores beaucoup moins résistantes (quinze secondes), le second, en particulier, lorsqu'elles sont séchées sur du cuir ou sur des grenats de Bohême. Mais déjà Geppert (6) avait reproché à la vapeur de mouiller les spores plus ou moins rapidement, ce qui introduit une cause d'erreur. Il se contentait de faire bouillir à feu nu, dans une capsule de porcelaine, les spores en suspension dans l'eau ou séchées d'abord sur des fils de soie. J'ai adopté la technique suivante, qui m'a paru préférable. Les spores, mises en suspension dans l'eau physiologique, sont aspirées dans une pipette étirée en olives. On sépare ensuite les olives en chauffant les étranglements et scellant sur une petite flamme, et l'on obtient ainsi une série d'ampoules remplies de liquide, sauf une bulle d'air à l'extrémité. Ces ampoules, disposées sur de petits supports, sont plongées dans l'eau, que l'on fait bouillir dans une bassine munie d'un couvercle (précaution sans laquelle le thermomètre ne monte pas à 100 degrés); après le temps voulu, on les retire et on les immerge dans l'eau froide. On ouvre ensuite les ampoules et ensemence avec une pipette. Pour mesurer la durée du chauffage à 100 degrés, il faut déduire le temps nécessaire pour élever la température du liquide intérieur. Je me suis servi comme indice d'une substance insoluble dans l'eau, cristallisée en grandes tablettes blanches et fondant au voisinage de 100 degrés, le rétène (méthylisopropylphénanthrène). L'échantillon que je me suis procuré fondait à 90 degrés; après deux cristallisations dans l'alcool, il fondait à 96 degrés (au bloc Maquenne); les tables donnent même le chiffre de 98°5. Dans l'ampoule pleine de liquide et plongée dans l'eau bouillante, les cristaux fondaient au bout de douze secondes; j'ai déduit chaque fois dix secondes des temps de chauffage. Dans d'autres essais, où je chauffais dans 10 cent. cubes de liquide, en tube scellé, des morceaux de peau infectés, la fusion se produisait après quarante secondes: l'écart montre l'utilité de cette petite épreuve.

On ignore jusqu'à présent à quoi tiennent les variations de résistance des spores, et surtout on ne sait pas préparer à

volonté des spores résistantes. Von Esmarch, comparant celles qu'il obtenait sur gélose et sur pomme de terre, concluait que le choix du milieu n'a pas d'influence. Krönig et Paul n'ont pas réussi à augmenter la résistance ni en sélectionnant les germes, ni en multipliant les passages sur l'animal. Weil (7) a échoué dans d'autres tentatives. Je n'ai pas été plus heureux; mais j'ai pu faire quelques observations sur l'atténuation de la résistance.

Les expériences ont porté sur 8 races de charbon, dont 5 étaient conservées dans les collections de l'Institut Pasteur; une (n° III) venait d'être isolée d'une épidémie bovine; deux étaient des charbons algériens, envoyés par l'Institut Pasteur d'Alger. Suivant une opinion classique, j'avais, pour obtenir rapidement des spores, employé un milieu pauvre qui contenait par litre :

Peptone Chapoteaut	2	grammes.
Sel de cuisine.	5	—
Glucose.	2	—
Gélatine	20	—
Gélose	15	—

D'après Osborne (8), la richesse en spores est proportionnelle à l'abondance des cultures, et par suite moindre sur les milieux pauvres. Mes observations ne contredisent pas directement cette opinion, car les cultures sur le milieu pauvre étaient moins riches que les cultures sur les milieux ordinaires. Mais le milieu pauvre permettait d'éliminer plus rapidement les germes non sporulés. La sporulation commençait après quarante-huit heures; en trois jours, 3/4 des germes environ étaient sporulés; après six à sept jours, on ne trouvait plus, si la sporulation avait été régulière, de formes végétatives que dans la partie inférieure de la culture. Sur le même milieu plus riche en peptone (20 grammes), les spores apparaissaient dès le second jour; 1/4 environ des germes étaient sporulés après 3 jours, 1/3 à 1/2 seulement après sept jours. Nous verrons que la résistance des spores était également moindre.

La résistance des spores de la première culture, pour

chacune des 8 races, est indiquée dans le tableau suivant :

Tableau I.

Nos	RACE	4 minutes.	3 minutes.	2 minutes.	1 minute.	30 secondes.	10 secondes.	1 seconde.
1	I. . .	—	+	+	+			
2	II. . .	—	+	+	+			
3	III. . .	—	+	+	+			
4	IV. . .	—	+	+	+			
5	V. . .	—	—	+	+			
6	VI. . .	.....	—	—	—	—	—	+
7	Alg. I.	.....	—	—	—	—	—	+
8	Alg. II.	.....	—	—	—	+		

Elle a varié de une seconde à trois minutes. Les charbons algériens se distinguaient par leur fragilité : j'ai pu constater, sur des préparations, qu'elle coïncidait avec une mauvaise sporulation ; les formes d'involution étaient nombreuses ; les préparations colorées par la méthode de Möller montraient des granulations rouges, plus petites que des spores. Cependant, j'ai trouvé, sur des cultures repiquées à partir de cette première série, des spores pures et très bien colorables, qui ne supportaient pas plus d'une minute de chauffage. Parmi les autres races, la dernière (n° VI) différait seule notablement du reste du groupe. La comparaison des huit échantillons permet de considérer la race comme un des facteurs de la résistance ; mais leur histoire antérieure, que je ne possédais pas, pouvait aussi être responsable des écarts. J'ai cru remarquer que les milieux plus secs fournissaient des spores moins sensibles, par exemple lorsque la gélose a été un peu desséchée à l'étuve avant d'ensemencer, ou que les tubes ne sont pas capuchonnés. Mais une expérience comparative avec deux tubes, dont l'un était capuchonné avec du papier et l'autre avec du caoutchouc (charbon IV), a donné respectivement des résistances de vingt secondes et une minute ; d'après cet essai, la dessiccation du milieu ne serait pas une circonstance suffisante. Par contre, diverses causes de fragilité des spores se dégagent des tableaux suivants :

1° L'âge de la culture entraîne une résistance légèrement croissante au début, stable pendant quelque temps, puis décroissante. J'ai rassemblé, dans la partie A du tableau II, des résistances décroissantes ; dans la partie B, des résistances fixes ou croissantes. On y trouve des chiffres en baisse à partir du dix-septième et du vingt-deuxième jour ; stationnaires entre le septième-huitième et le dix-neuvième-vingt-troisième ; en hausse après le cinquième, huitième et quinzième jour. L'optimum paraît variable, selon les cas, entre le huitième et le quinzième jour environ.

Tableau II. — **A**.

RACE	III (BOUILLON)		III		I_1 (1)		
Age	20 jours.	60 j.	19 j.	69 j.	5 j.	49 j.	10 mois.
Résistance.	1 min.	< 10 sec.	1 min.	< 30 s.	3 m.	1 min.	30 sec.

RACE	I_2		II_3		Alg. II_2		IV_2	
Age	23 jours.	7 mois.	7 j.	6 mois.	15 j.	22 jours.	9 j.	17 j.
Résistance	3 min.	< 1 min	3 min.	1 min.	1 min.	30 sec.	3 min.	2 min.

(1) Les indices (I_1, I_2) désignent le numéro de la génération

Tableau II. — **B**.

III_2			V_1		III_1		J_2		Alg. II_1	
7 jours.	19 jours.	23 jours.	8 jours.	19 jours.	8 jours.	15 » jours.	5 jours.	11 jours.	15 jours.	27 jours.
1 min.	1 min.	1 min.	2 min.	2 min.	3 min.	3,30 min.	2 min.	3 min.	30 sec.	1 min.

2° L'influence de la nature et la composition du milieu se manifeste par une résistance moindre en bouillon, sur gélose riche en peptone, sur gélose pauvre à réaction neutre au tournesol, que sur gélose pauvre à réaction neutre à la phtaléine

Tableau III.

Nos	RACES	GÉLOSE PAUVRE neutre à la phtaléine.	GÉLOSE PAUVRE neutre au tournesol.	GÉLOSE peptonée.	BOUILLON
1	III	3 minutes (8e j.). 3,30 min. (15e j.).	»	1 min. (19 j.). 30 sec. (67 j.).	1 min. (20 j.). 5 sec. (60 j.).
2	I	3 minutes (4e j.). 1 minute (19e j.).	»	1 min. (7 mois).	1 min. (16 j.). 1 min. (20 j.).
3	Alg. I	10 secondes.	»	30 secondes.	»
4	V	2 minutes (8e j.).	1 minute (8e j.).	1 min. (25 j.).	
5	IV	2 minutes (8e j.).	1 minute (8e j.).		

3° Un fait plus inattendu, et plus nouveau, est la dégradation successive des spores par repiquage des cultures sur gélose pauvre, c'est-à-dire sur un mauvais milieu au point de vue de la richesse des cultures. Dans le tableau IV, les races I et IV ont régulièrement baissé à partir de la seconde ou la troisième génération; pour la race III, après une baisse à la seconde culture, j'ai obtenu avec la troisième des résultats opposés sur trois ensemencements, faits dans des conditions en apparence identiques : deux indiquent une chute, le troisième une ascension. Par contre, les races algériennes semblent s'habituer à sporuler sur le milieu choisi; très peu résistantes au début, les spores ont une tendance à remonter par les passages

Tableau IV.

	A				B	
RACES	I	II	III	IV	ALG. I	ALG. II
1re culture.	3 minutes (5 jours).	3 min. (6 j.).	3 min. 2 min. (8 j.). 3 min.	3 min. (15 j.).	< 10 s. (16 j.).	30 sec. (15 j.). 1 min. (27 j.).
2e culture.	3 min. (23 j.). 1 min. (16 j.).	3 min. (11 j.).	1 min. 7 j.).	3 min. (9 j.).	30 sec. (21 j.).	1 minute (15 jours).
3e culture.	1 minute (8 jours).	2 m. 45 (7 j.).	< 10 s. (17 j.). 30 s. (21 j.). 2 m. (10 j.).	1 min. (11 j.).	1 min. (11 j.).	2 minutes 12 jours).
4e culture.	30 secondes (8 jours).			1 min. (11 j.).	1 min. (10 j.).	1 minute 10 jours).

4° Les préparations de spores destinées aux essais ont été considérées comme stables par les uns [von Esmarch (3)] comme sujettes à baisser par les autres [Weil (7), Krönig et Paul (2)]. Mes émulsions de spores se conservaient sans changement pendant un ou deux jours. Pour les spores séchées sur des lamelles de verre, j'ai remarqué qu'à quelques jours d'intervalle, deux expériences identiques donnaient des résultats différents; en voici des exemples :

Tableau V. — Spores traitées par le sublimé en présence d'acide et quelquefois de sérum de cheval.

CONCENTRATIONS du sublimé.	SPORES 3 min. IV, fraîches.	6 JOURS	SPORES 2 min. III, fraîches.	4 JOURS	SPORES 2 min. III, fraîches	6 JOURS	SPORES 2 min. III, fraîches.	9 JOURS	SPORES 30 sec. algér. I, fraîches.	JOURS
1 : 6000.									+	+
5000.										
4000.	+									—
3000.			+	— —		—		—		
2000.	—		+	+ —		—		—		
1000.		—		+			—			
500.	—	—		+	—					
300.	—	—								

Il est arrivé aussi que, dans les mêmes délais, la sensibilité des spores ne changeait pas.

II

Emploi des spores séchées sur des lamelles de verre.

On admet aujourd'hui que la méthode la plus précise pour étudier l'action des antiseptiques consiste à mettre les spores en suspension dans le désinfectant, puis à les transporter après neutralisation dans le milieu nutritif. Mais cette technique, excellente lorsqu'il s'agit d'établir les propriétés générales d'un antiseptique, comporte des conditions très différentes de celles que l'on rencontre dans la pratique de la désinfection. Je désirais, au contraire, opérer sur des spores séchées et

représenter par quelque chose les difficultés qui s'opposent presque toujours à la pénétration des antiseptiques. Il était facile de satisfaire à ces exigences en s'inspirant du dispositif employé par Chamberland et Fernbach (9). On laisse tomber d'une pipette effilée III gouttes de la suspension des spores sur une lamelle de verre placée au fond d'un tube de 8 centimètres bouché au coton; puis on sèche rapidement dans le vide. Après dessiccation on peut recouvrir la lamelle de sérum de cheval, que l'on dessèche à son tour. Il est très facile de retirer ces lamelles avec une pince flambée, de les faire passer dans les liquides de lavage et de les ensemencer en bouillon, tout cela avec une asepsie parfaite. Krönig et Paul reprochent au verre de se mouiller inégalement; la critique, valable peut-être pour des expériences de quelques minutes, comme les leurs, ne m'a pas arrêté pour des essais qui devaient durer vingt-quatre heures.

Le procédé, resté classique depuis Koch, des spores séchées sur des fils de soie est d'une manipulation très incommode. De plus, Geppert (6a) a montré que la pénétration soit du désinfectant, soit de l'agent destiné à le neutraliser, est très irrégulière. Les essais comportent donc un facteur variable, dont l'influence pour chaque cas particulier ne peut pas être appréciée. La méthode de Krönig et Paul (2) a les apparences d'une rigueur parfaite; mais ce n'est pas sans motifs que j'y ai renoncé. Krönig et Paul chargent de spores des grenats de Bohême de diamètre uniforme. Ces grenats, après avoir passé par la solution antiseptique et les lavages appropriés, sont vigoureusement agités dans l'eau stérile. Une quantité mesurée de cette eau est délayée dans la gélose liquide, que l'on coule ensuite dans une boîte de Pétri. L'expérience montre que le nombre de germes détachés pendant l'agitation est sensiblement constant et, par suite, que l'état de ces germes représente exactement l'effet moyen de la désinfection. L'avantage est alors que l'on peut compter les germes survivants, avoir des données numériques sur une stérilisation incomplète, et surtout éviter que les résultats, faussés par la présence d'un seul germe exceptionnellement résistant, ne fassent illusion. Si ce dernier inconvénient est sérieux lorsqu'on fait des recherches théoriques sur les propriétés des antiseptiques, il

semble que la valeur pratique d'un désinfectant ne puisse être mesurée qu'à la stérilisation complète. L'hypothèse de germes exceptionnels a plus de portée lorsqu'on opère sur un petit nombre; une première agitation, sur laquelle on fait la numération, n'en détache que 6000 à 10000 environ. En déposant III gouttes de la suspension de spores sur une lamelle, j'avais, d'après deux numérations, 8 millions et 30 millions de germes. Autre critique : il est très difficile de se faire une idée d'une stérilisation relative par le nombre des germes survivants; ce nombre peut aller de 1 à 2000 et 3000. Pour les mêmes conditions de concentration et de durée, on trouve des écarts, avec le sublimé, de 2 à 32. D'ailleurs, lorsqu'un antiseptique laisse subsister 5 colonies, et un autre 1000, le premier ne peut pas être considéré comme 200 fois plus actif que le second. L'ordre des nombres est seul à considérer; la précision des chiffres, elle-même, est illusoire. Enfin, d'une préparation de grenats à l'autre, les chiffres obtenus peuvent être différents parce que la richesse en spores de la suspension qui a servi à charger ces grenats était différente. Pour toutes ces raisons, j'ai préféré poursuivre la stérilisation totale, en faisant varier la concentration surtout et, à l'occasion, le temps. Le seul désavantage du procédé des lamelles est la difficulté d'ensemencer après la désinfection sur un milieu solide. Cet ensemencement ne présenterait de garanties que si l'on pouvait détacher toutes les spores de la lamelle et les répartir dans le milieu, ce qui est impraticable. Je me suis contenté des cultures en bouillon; la différence n'est d'ailleurs sensible qu'à la limite et, sans doute, pour des temps courts ou des doses faibles.

III

La neutralisation du sublimé.

Parmi les agents que l'on pourrait employer à la désinfection des peaux figure le sublimé. M. Seymour-Jones, qui possède une longue pratique de la tannerie, a proposé de tremper les peaux sèches pendant vingt-quatre à quarante-huit heures dans un bain qui contient 1 : 5000 de sublimé, et pour les grosses peaux 1 p. 100, pour les petites 0,2 à 0,3 p. 100 d'acide for-

mique. L'efficacité du sublimé à cette faible concentration est-elle suffisante?

Depuis Geppert (6b), on sait que l'effet apparent du sublimé est très variable selon que l'on neutralise ou non le mercure avec un sulfure alcalin ou avec l'hydrogène sulfuré. Mais il ne s'agit pas seulement de détruire l'excès de sublimé. Entre la quantité de sulfure ou d'hydrogène sulfuré suffisante pour précipiter tout le sublimé, et celle qui fait apparaître la plus grande vitalité chez les spores, il y a une marge très étendue. Si l'on employait une solution relativement concentrée de sublimé, il faudra neutraliser avec cinq fois la quantité suffisante; mais après le contact avec une solution faible ou en présence de traces, la quantité absolue d'hydrogène sulfuré, par exemple, devra rester à peu de chose près la même et atteindra jusqu'à 400 fois celle qui transformerait tout le mercure en sulfure [Croner et Neumann (10)]. Il semble que le sublimé adhère à la spore de telle manière qu'il ne l'abandonne qu'en présence d'un énorme excès de sulfure ou d'hydrogène sulfuré. A ce moment, la spore paraît avoir très peu souffert du contact avec le sel de mercure. Geppert avait trouvé qu'après un traitement de vingt heures par le sublimé à 1 p. 1000, elle n'infectait plus la souris; mais il fallait trois jours de contact avant qu'elle cessât de donner des cultures. Ces délais et cette concentration sont bien loin de réaliser la stérilisation, d'après Ottolenghi (11), si l'on a soin, après une neutralisation bien conduite, d'ensemencer dans du bouillon additionné de son volume de sérum, puis de repiquer du bouillon, où la culture n'est pas visible, sur une plaque de gélose. Dans ces conditions, on obtient encore des cultures après neuf jours de contact avec le sublimé à 2,70 p. 100. Ce résultat extraordinaire a été pleinement confirmé par Croner et Neumann. Il faut donc en venir à l'opinion que le sublimé ne tue la spore charbonneuse qu'à une limite que l'on n'atteint jamais dans la pratique. La mort apparente est liée à l'insuffisance de neutralisation, puis à l'absence de conditions très favorables au développement des germes. Ces expériences n'ont cependant qu'une portée pratique relative, car, bien avant d'être tuées, les spores sont, en réalité, inoffensives. Mais alors, quel sera le degré de stérilisation qui donnera une sécurité suffisante?

Les peaux, après le traitement par le sublimé, seraient seulement lavées à l'eau salée. Elles ne courent le risque d'être neutralisées pendant les opérations du tannage que dans un cas : si l'on emploie un sulfure pour l'épilage. Parmi les auteurs qui ont déjà soumis le procédé de Seymour-Jones à un contrôle expérimental, les uns uns ont obtenu des résultats bons [Schnuerrer (12) et Sevcik (13)], et même parfaits [Moegle (14)], parce qu'ils ne neutralisaient pas les peaux; les autres ont constamment échoué, parce qu'ils neutralisaient [Hilgermann et Marmann (15), Schnuerrer (12b), Sevcik (13)]. La véritable question n'a été soulevée ni par les premiers, ni par les seconds : dans quelle mesure les préparations de sulfure en usage dans les tanneries sont-elles capables de neutraliser le sublimé? L'écart des doses stérilisantes, avec ou sans neutralisation, est très grand. En voici deux exemples :

TABLEAU VI.

Spores séchées sur des lamelles recouvertes de sérum sec. Acide formique 0,5 p. 100; 24 heures.

CONCENTRATION du sublimé.	SPORES, 3 MINUTES (IV_2)		SPORES, 2 MINUTES (IV_2)	
	Sans neutralisation.	NH^4HS 1,6 p. 100.	Sans neutralisation.	NH^4HS 1,6 p. 100.
1 : 15000	—			
10000	—	.....	—	
8000	.....	.....	—	
6000				
5000				
2500				
1000	.....	-	.....	
500	.....		.....	
300	.....	-	.....	- -

La limite passe de 1 : 15000 et 1 : 10000 à 1 : 300. Il est évident qu'on se rapprochera de l'un ou l'autre de ces extrêmes selon que la neutralisation sera plus ou moins parfaite. On peut, d'autre part, dépasser la limite et atteindre une concentration en sulfure qui devient toxique à son tour. Geppert a montré, par des essais en série, qu'au delà d'une quantité

optima de sulfure, la toxicité se met à jouer; le nombre de colonies qu'on obtient avec la même dose de sublimé va en diminuant.

J'ai fait l'essai des préparations suivantes : 1° Sulfure de sodium (1) à 2 : 1000 pendant vingt-quatre heures, cinq jours et dix jours; 2° sulfure de sodium à 1 : 100 pendant deux et cinq jours; 3° sulfure de sodium à 3 : 100 pendant un et trois jours; 4° chaux (30 grammes par litre) additionnée de 2 : 1000 de sulfure de sodium pendant cinq et dix jours; 5° pâte composée de : chaux vive, 10 grammes; arsenic rouge (réalgar, orpin des tanneurs), 1 gramme; eau, 20 grammes, pendant un jour; 6° chaux à 30 grammes par litre additionnée de 1 gr. 5 de réalgar par litre, pendant dix jours. Ces dernières préparations sont faites en mélangeant la chaux vive fraîchement calcinée avec le réalgar, puis éteignant avec un peu d'eau et ajoutant ensuite le reste lorsque la réaction est terminée. Le tableau VII donne les résultats obtenus avec ces divers traitements.

Le sulfure de sodium à 2 : 1000 neutralise le sublimé. Mais si l'on augmente la concentration et prolonge le contact suffisamment, l'action toxique achève la destruction de la spore commencée par le sublimé. Cette influence ne se manifeste pas encore avec 1 p. 100 de sulfure pendant deux jours. Mais, au moins pour les échantillons qui ont servi à ces expériences, la concentration de 3 p. 100 pendant un jour et à une exception près de 1 p. 100 pendant cinq jours, a empêché le développement des cultures. (Avant de transporter les lamelles des sulfures concentrés dans le bouillon, elles passaient cinq minutes dans l'acide chlorhydrique à 1 : 1000, et cinq minutes dans l'eau. La même précaution était prise après les traitements par la chaux, qui laisse du carbonate adhérent aux lamelles, et par suite après les sulfures arsenicaux.) Il semble que le sublimé et le sulfure aient dans ces cas combiné leur action ; le sulfure seul, d'après Hilgermann et Marmann (15), tue les spores en quelques jours à 5 p. 100. Quant à la chaux, elle les tuerait en vingt-cinq jours d'après Ponder (15 *bis*), en plus de trois mois d'après Hilgermann et Marmann. Le mélange de chaux et de sulfure de sodium à 2 : 1000 paraît plus favorable à la stérili-

1) Sulfure de sodium cristallisé avec 9 mol. d'eau = 32,5 p. 100 de Na^2S.

sation que le sulfure sans chaux; mais il est encore capable de neutraliser l'effet du sublimé à 1 : 500 (n° 3).

TABLEAU VII. — **Sérum; acide formique 0,25 ou HCl 0,11 p. 100.**

NUMÉROS		CONCENTRATION en sublimé	NH HS 1,8 p. 100.	Na^2S 2 p. 1000.			Na^2S 1 p. 100.		Na^2S 3 p. 100.		CHAUX + Na^2S 2 p. 1000.		CHAUX + orpin dilués.	PATE de chaux + orpin.
			10 min.	24 h	5 j.	10 j.	2 j.	5 j.	1 j.	3 j.	5 j.	10 j.	10 j.	1 jour.
1	Sp. 10 sec.	1 : 7500	.....	....	....	....	..	..	—	—				
	(VI[1]).	5000	.....	....	...	....	..	..	—	—				
2	Sp. 1 min.	2000	.....	....	+	+	+	..	..	..				
	(IV[3]).	1000	+	+	+	+	+	..	..	..	+			
		500	+	+	....	....	..	..	..	..	+			
3	Sp. 1 min.	4000	.....	....	....	....	..	.	..	..	....	+	— —	
	(IV[4]).	2000	.....	....	....	..	..	.	..	..	....	—	— —	
		1000	+	...	....	....	..	..	..	.	....	+		
		500	+	....	....	....	.	..	..	..	....	+		
4	Sp. 1 min.	1000	+	....	....	...	..	.	..	..	....	...	... ..	+
	(VII[1]).	500	+	....	....	....	.	..	..	..	....	....	.....	+
5	Sp. 1 min.	5000	.....	....	...	....	..	—	—	—	...	— —	— —	
	(V[2]).	2500	.....	....	..	. .	..	—	.	—	....	— —	— —	
		1000	+	....	...	....	.	.	..	..	....	—		
		500	+	....	....	....	..	.	..	.				
6	Sp. 2 min.	4000	.....	...	...	....	..	..	+	..				
	(V[1]).	2000	+	....	....	..	..	.	+	..				
		1000	+	..	....	..	..	..	..	..				
		500	+	....	....	..	..	..	.	..				
7	Sp. 2 min.	5000	.....	....	...	....	..	—	—	—	....	—	— —	
	(IV[2]).	2500	.....	....	..	.	..	+	—	—	....	— —	+	
		1000	+	....	...	.	.	—						
		500	+	....	....	...	..	—						

Les préparations arsenicales sont plus intéressantes; il se forme probablement dans la réaction très complexe entre la chaux et le sulfure d'arsenic, et à la faveur de la température, de l'arsénite, du sulf-arsénite, et du sulfure de calcium. La concentration en sulfure soluble et son pouvoir de réaction avec le sublimé sont suffisants pour neutraliser lorsqu'on emploie

la pâte ; avec les préparations diluées, qui sont d'un usage courant, la neutralisation ne paraît pas obtenue. Il n'est guère possible que la toxicité des sels arsenicaux intervienne ; elle serait plus sensible avec la pâte. D'ailleurs, d'après Hilgermann et Marmann, une pâte à 20 p. 100 de chaux et 1 p. 100 de réalgar ne tue pas les spores en neuf jours. C'est donc bien une neutralisation incomplète qui assure l'efficacité de la désinfection.

Expériences sur des peaux. — Bien que ces expériences sur des préparations de spores aient lieu dans des conditions beaucoup mieux définies que les essais sur des peaux infectées ne peuvent l'être, il fallait évidemment appliquer à des peaux les résultats. Je n'ai disposé que de peaux de cobayes tués par inoculation du charbon : ces peaux, séchées dans des conditions convenables, contenaient des spores. La répartition en était assez régulière pour que, sur 20 inoculations au cobaye, et même sur 40 (en comprenant des peaux traitées par des méthodes imparfaites de stérilisation), 2 seulement n'aient pas infecté l'animal.

Après le traitement par le sublimé, la stérilisation de ces peaux était contrôlée par inoculation à 3 cobayes pour chacune, et par culture en bouillon. La première épreuve seule était considérée comme démonstrative, puisqu'elle témoignait du pouvoir infectant des spores survivantes ; d'ailleurs, dans les épreuves sans neutralisation, la réaction avec les tissus débarrassait probablement la peau de l'excès de sublimé. D'autre part, la formation d'une fausse membrane autour du fragment inséré diminuait sans doute les chances de septicémie charbonneuse ; mais dans les contaminations spontanées il faut aussi compter avec les défenses de l'organisme. Quant à l'épreuve par la culture, elle perd beaucoup de sa valeur, au moins dans les cas négatifs, du fait que le développement du charbon était gêné par la pullulation d'autres microbes, *mesentericus* et *subtilis* ; ils rendaient la recherche du charbon extrêmement hasardeuse.

Le tableau VIII indique les résultats obtenus. Sur 11 expériences (4 peaux différentes), avec 1 : 5000 à 1 : 3000 de sublimé, et 0,60 à 0,25 p. 100 d'acide formique, toutes les inoculations (31) ont été négatives ; le charbon a été isolé une seule fois des cultures.

TABLEAU VIII.

Température : 20 degrés. Temps : 24 heures. 4 et 3 gr. de peau sèche p. 50 cent. cubes de liquide.

N°	RACE	SUBLIMÉ	ACIDE formique. p. 100.	TRAITEMENT APRÈS LA STÉRILISATION	INOCULÉ au bout de :	RÉSULTATS I	RÉSULTATS II	RÉSULTATS III	CULTURES
1	Ia.	1 : 3000	0,60	»	3 jours.	—	—	—	»
2	Ia.	4000	0,60	»	3	—	—	—	1 culture positive.
3	II.	3000	0,60	»	1	—	—		»
4	II.	4000	0,60	»	3		—		»
5	III.	3000	0,25	»	26	—		—	»
6	III.	4000	0,25		26	—	—	—	»
7	III.	5000	0,25	»	26	—			»
8	III.	5000	0,25	Agité à la machine, 1 heure dans NaCl 10 p. 100.	1		—		Cultures stériles.
9	Alg.	4000	0,25	»	16		—	—	»
10	Alg.	5000	0,25		16	—	—	—	Cultures stériles.
11	Alg.	5000	0,25	Agité à la machine, 1 heure dans NaCl 10 p. 100.	1	—		—	—
12	III.	3000	»	»	19		—	—	»
13	III.	5000	»	»	19		—	—	»
14	Alg.	3000	»	»	7	—	—	—	»
15	Alg.	5000	»		7				»
16	IVa.	3000	»		2	—		—	»
17	IVa	5000	»		2	—	—	—	»
18	IVa.	3000	»	Neutralisé Na^2S 2 : 1000. 24 heures.	1		—	—	»
19	Iva.	5000	»	Neutralisé Na^2S 2 : 1000. 24 heures.	1	—	—	—	»
20	IVb.	5000	»	Agité à la machine, 1 heure dans NaCl, 10 p. 100.	2	+		—	»
21	IVb.	5000	»	Neutralisé $Ca(OH)^2$ et Na^2S 2 : 1000, 10 jours.	2	—	+	+	»
22	IVb	5000	0,25	Neutralisé $Ca(OH)^2$ et Na^2S 2 : 1000, 10 jours..	2	—	—	—	»
23	IVb	5000	0,25	Neutralisé avec une pâte de chaux et d'orpin. 40 h.	4			—	»
24	IVb.	5000	0,25	Neutralisé dans la chaux et l'orpin étendus, 10 jours.	2	—	—		Cultures stériles.

J'ai fait de plus 7 essais (4 peaux différentes) avec les mêmes doses sans addition d'acide, et obtenu la stérilisation apparente six fois ; la septième, 2 cobayes sur 3 sont morts. Les spores de cette peau résistaient deux minutes au chauffage à 100 degrés, celles des autres une minute à 100 degrés, ou seulement cinq minutes à 90 degrés. Au contraire, les peaux neutralisées au sulfure de sodium à 2 : 1000 pendant vingt-quatre heures (nos 18, 19) étaient restées virulentes. De même après un traitement de quarante heures par la pâte de chaux et d'orpin (arsenic rouge), étendue sur le côté chair (n° 23). Quant au mélange de chaux étendue et de sulfure de sodium à 2 : 1000, il n'a pas fait réapparaître la vitalité des spores (n° 22) ; on ne peut en effet pas tirer argument de la peau n° 21, car elle était traitée par le sublimé sans acide, et déjà virulente avant la neutralisation (n° 20). Ainsi, la peau s'est comportée comme les spores sur lamelles dans les cas les plus favorables ; est-ce un hasard qui ne se reproduirait pas ? ou l'inoculation à l'animal est-elle moins sensible que la culture, les spores se trouvant au stade d'atténuation décrit par Geppert ? Il faudrait de nouveaux essais pour porter un jugement. Enfin, comme dans le cas des spores sur lamelles, la chaux étendue, additionnée d'arsenic rouge, n'a pas neutralisé le sublimé. Les cultures mêmes sont restées stériles ; avant d'ensemencer, la peau avait été d'abord soigneusement lavée à l'eau stérile, maintenue quelques heures dans une solution d'acide chlorhydrique à 1 : 1000, et lavée à nouveau. Une conclusion se dégage de ces expériences : c'est que les pelains aiguisés à l'arsenic sont les moins dangereux pour l'épilage des peaux stérilisées au sublimé. Je n'ai pas fait l'essai du sulfure de sodium à 3 p. 100 pendant vingt-quatre heures ou à 1 p. 100 pendant cinq jours, dans la crainte que des concentrations aussi fortes ne soient pas supportées par les peaux pendant ces délais. On utilise quelquefois, pour des cuirs inférieurs, des solutions encore plus concentrées, mais pendant quelques heures seulement. Il se peut que les titres de 3 p. 100 pendant vingt-quatre heures et 1 p. 100 pendant cinq jours ne soient pas impraticables.

Je n'ai malheureusement pas pu étendre mes expériences à des peaux de chèvre, de mouton, de bœuf naturellement infectées. Cette lacune dans la critique de la méthode de

Seymour-Jones est comblée par les résultats qui viennent d'être publiés par Moegle (14), par Sevcik (13). Moegle a traité par le sublimé à 1 : 5000 ou 1 : 10000 et l'acide formique à 1 p. 100 une dizaine de peaux de bœuf; aucune n'a fourni de cultures, après lavage au carbonate de soude. Sevcik, employant sur des peaux de bœuf, de cheval et de mouton 1 : 5.000 de sublimé et 1 p. 100 ou 0,5 p. 100 d'acide formique, n'a eu que 4 insuccès sur 58 expériences; avec des doses plus élevées, 1 : 3000 à 1 : 500, la stérilisation a toujours été efficace, dans 63 essais; enfin avec 1 : 10000 et 1 : 20000 de sublimé, elle a encore réussi 19 fois sur 24. Le danger de contamination, s'il n'est pas totalement supprimé, peut donc être considéré comme très faible, aussi longtemps que les peaux ne sont pas exposées à la neutralisation du sublimé. Et ce danger ne réapparaîtrait jamais, si l'on avait soin d'épiler à la chaux aiguisée avec le sulfure d'arsenic, et peut-être au sulfure de sodium très concentré.

IV

Le pouvoir antiseptique du sublimé en présence d'acide et de matière protéique.

On a remarqué depuis longtemps que la présence de protéines diminue le pouvoir antiseptique du sublimé. Elles sont coagulées, et le coagulum entraîne une partie du sel de mercure, ce qui abaisse le titre de la solution. Mais la combinaison insoluble, d'ailleurs mal définie, de matière protéique et de sel de mercure se dissout dans certains acides, si les concentrations respectives sont convenables, et aussi dans le chlorure de sodium en milieu neutre. C'est ainsi que Behring tuait la spore charbonneuse dans le sérum avec 1 : 1000 de sublimé et 9 : 1000 de SO^4H^2, en seize heures (16). La préparation de sublimé de la pharmacopée allemande associe le sublimé au chlorure de sodium.

Dans la méthode de Seymour-Jones, on fait agir l'acide formique à côté du sublimé. L'addition d'acide est indispensable, parce que la plupart des peaux à désinfecter ont été séchées à fond, dans des pays chauds; il serait impossible de

les mouiller convenablement si on ne leur faisait pas subir un reverdissage, opération pour laquelle l'acide formique convient parfaitement. Mais le résultat désiré peut être obtenu avec des concentrations de 0,20 à 0,25 p. 100. Le taux de 1 p. 100, indiqué au début par Seymour-Jones, ne serait utile que si la présence d'acide augmentait le pouvoir antiseptique. C'est ce qui m'a conduit à examiner : 1° l'influence des acides sur l'activité du sublimé en général; 2° leur rôle en présence de sérum séché sur les lamelles souillées de spores; 3° l'effet du sérum lui-même.

J'ai neutralisé le sublimé, après vingt-quatre heures de contact, par le sulfhydrate d'ammoniaque, sans viser à atteindre les limites d'Ottolenghi et de Croner et Neumann. Ce sulfhydrate était fraîchement préparé, pour quelques jours au plus, en saturant de H^2S la solution d'ammoniaque du laboratoire, diluée à 1 : 5; d'après le poids de sulfate obtenu à partir du sulfure de plomb précipité par 1 cent. cube, il contenait 9,41 p. 100 de NH^4HS. Je l'ai employé à deux dilutions différentes, dont les titres approximatifs étaient 2 : 1000 et 16 : 1000. Les lamelles y séjournaient pour des raisons de commodité, seulement cinq minutes, puis étaient lavées cinq minutes dans l'eau distillée. La concentration la plus forte favorisait beaucoup plus le développement des spores, comme le montre l'essai suivant :

Spores résistant 10 secondes à 100 degrés : acide formique 0.5 p. 100.

	CONCENTRATION DU SUBLIMÉ			
	1 : 6000	1 : 5000	1 : 4000	1 : 3000
Solution faible de NH^4HS	—	—	—	—
Solution forte de NH^4HS	+	+	—	+

C'est la solution forte qui m'a servi le plus souvent; on verra par quelques exemples que l'emploi de l'autre, c'est-à-dire qu'une neutralisation moins complète, rend plus sensible l'influence des facteurs accessoires susceptibles de modifier les résultats.

D'après Rohrkoff (17), l'acide tartrique ou chlorhydrique à 0,5 p. 100 affaiblissent le pouvoir antiseptique du sublimé. La raison en est donnée par Krönig et Paul (2) : l'ion Hg est le

principal agent de la désinfection (mais non le seul); si l'on ajoute soit un acide dont le sel de mercure est moins dissocié que le bichlorure, soit même l'acide chlorhydrique, qui possède avec lui un ion commun, on ne peut qu'affaiblir le pouvoir antiseptique, car on diminue l'ionisation. Cependant Paul, Birstein et Reuss (18) ont reconnu plus tard que l'addition du sel de soude à l'acide correspondant, bien que diminuant l'ionisation de l'acide, augmentait un peu son action; Gegenbauer et Reichel (19) confirment le fait pour l'acide chlorhydrique et le chlorure de sodium. L'interprétation de Krönig et Paul n'est donc bonne que lorsque l'expérience ne vient pas la contredire.

Les tableaux suivants montrent dans quelle mesure la stérilisation est gênée par l'addition d'acide : 1° pour les spores sans sérum (tableau IX); 2° pour les spores en présence de sérum (tableau X).

Tableau IX. — **Sublimé sans acide et avec acide, sans sérum.**

Concentration du sublimé.	A. — Neutralisé NH^4HS 1,6 p. 100.						B. — Neutralisé NH^4HS 0,2 p. 100					
	Spores 30 secondes (Alg. I_1).		Spores 1 minute (Alg. I_3).		Spores 2 minutes (IV_2).		Spores 10 sec. (III_5).		Spores 1 min. (III_5).		Spores 3 min. (III_7).	
		Ac. form. 0,25 p. 100		Ac. form. 0,25 p. 100		Ac. form. 0,25 p. 100		Ac. form. 0,50 p. 100		Ac. form. 0,50 p. 100		Ac. form. 0,50 p. 100
1 : 50000	...	...	...	...	...	...	—	...	...	...	+	
20000	...	...	...	...	...	...	—	...	...	...	—	
15000	...	...	+	...	...	...	...	+	...	...	—	+
10000	...	...	—	...	...	...	...	...		+	...	+
8000	—	...	—	—								
6000	—	...	—	—								
5000	—	...	—	+	.	...	...	...	—	—		
4000	...	.		—								
3000	...	—	—	—								
2000	...	—	...	...	—	+						
1000	...	...	...	...	+	—						
500	...	...	...	...	—	—						

Dans quelques cas, l'acide chlorhydrique est substitué à l'acide formique: je me suis assuré par d'autres expériences que les résultats étaient équivalents.

Dans le tableau IX (sans sérum), lorsque la stérilisation est obtenue avec des doses faibles de sublimé, soit parce que les spores sont peu résistantes, soit parce que la neutralisation est imparfaite, la présence d'acide entraîne une baisse du pouvoir désinfectant (de 1 : 5000 à 1 : 2000 et 1 : 4000; de 1 : 50000 ou 1 : 20000 à moins de 1 : 15000 ou 1 : 10000). Au contraire, lorsqu'il faut aller jusqu'aux doses de 1 : 1000 et 1 : 500 sans acide, l'équilibre s'établit entre les deux séries. C'est le cas général dans le tableau X (avec sérum) où, à une exception près, la dose nécessaire est au moins de 1 : 1000.

Tableau X. — **Sublimé sans acide et avec acide, avec sérum.**

Concentration du sublimé.	A. — Neutralisé NH^4HS 1,6 p. 100								B. — Neutralisé NH^4HS 0,2 p. 100		
	Spores 1 minute (Alg. I_4).	Spores 3 minutes (IV_1).		Spores 3 minutes (IV_2).	Spores 3 minutes (IV_2).			Spores 2 minutes (III_3).		Spores 3 minutes (II_4).	
	HCl 0,3 p. 100.	Acide form. 0,5 p. 100.		Acide form. 0,5 p. 100.	Acide form. 0,5 p. 100.	HCl 0,3 p. 100.		HCl 0,185 p. 100.			Acide form. 0,6 p. 100
1 : 5000	..	.....	..	.....	.....	.....	.....	.....		+ + +	+ + —
4000	—	.	..	.....	.....	.....	.....	.....		.....	+ — —
3000	.	—									
2000	—	—	..	—	— — —	—	+	—			
1000	..	.....	—	— —	— — ..	—	—	—	..	—	
500	..	.....		— —	.. — —	—	..	—	—	—	
300	.	.....	..	—	.. ..		—	—	—		

La différence apparaît ici dans l'ensemble comme peu importante. Du moins, l'acide n'a-t-il pas une seule fois une influence favorable. En présence de sérum, ce résultat est surprenant, car le sublimé seul coagulait toujours le sérum qui, avec l'acide formique, restait au contraire dissous. Avec l'acide chlorhydrique, j'ai constaté que la coagulation persistait quelquefois.

surtout pour les concentrations fortes en sublimé; la stérilisation n'en paraissait d'ailleurs pas affectée.

Pour voir si la présence de sérum était indifférente, j'ai comparé dans un nouveau tableau (XI) des expériences faites avec les mêmes spores, les unes nues, les autres recouvertes de sérum, en présence d'acide; ces spores étaient toutes relativement peu résistantes.

Tableau XI. — **Sublimé avec acide, sans et avec sérum. Neutralisé NH^4HS 1,6 p. 100.**

CONCENTRATION du sublimé.	SPORES, 30 SEC. (III_3).		SPORES, 30 SEC. (Alg II_1).		SP., 1 MIN. (Alg. I_3).		SPORES, 2 MIN. (III_3).		SPORES, 2 MIN. (III_3).	
	Ac. formique 0,5 p. 100.		Ac. formique 0,25 p. 100.		Ac. form. 0,25 p. 100.		HCl 0,185 p. 100.		Ac. formique. 0,5 p. 100.	
		Sérum.		Sérum.		Sér.		Sér.		Sérum.
1 : 8000	...	...	...	...	...	...	.			
6000	...	...	...	...	...	...	+	—		
5000	...	...	...	...	+	...	+	—		
4000	...	...	+	+	—	—	+	+	.	.
3000	+	+ + +	+ —	+ —	—	—	+ —	—	+	— + + +
2000	+	+ + —	—	— —	...	...	—	—	—	+ + —
1000	...	...	...	...	...	...	...	...	—	+ + +
500	...	...	...	...	...	...	...	...	...	+ + +

Pour les trois premières séries, il n'y a pas de différence sensible; la dernière est franchement et l'avant-dernière légèrement meilleure sans sérum. Le résultat n'est donc pas entièrement négatif; mais l'écart est inférieur à celui qu'on attendrait. L'explication en est sans doute que la quantité de sérum employée d'une part, et l'acide ajouté de l'autre, atténuent dans des proportions à peu près égales l'action du sublimé; les deux facteurs ne s'additionnent pas. Si cela est vrai, la différence entre les spores nues et recouvertes de sérum doit être plus nette lorsqu'on n'ajoute pas d'acide. Je ne possède pas de séries parallèles, avec ou sans sérum, sans addition d'acide. Dans les exemples suivants, les lamelles ont été seu-

lement lavées dix minutes à l'eau, sans neutralisation au sulfure :

TABLEAU XII. — **Sérum acide et sans acide, sans neutraliser.**

CONCENTRATION du sublimé.	SPORES 3 minutes (IV_2).		SPORES 2 minutes (IV_2).	
	Ac. formique. 0,5 p. 100.	Sans acide.	Ac. formique. 0,5 p. 100.	Sans acide.
1 : 15000	—	—	—	+
10000	—	+	—	+
5000	—	+	—	+
2000	—	+	—	—

L'écart est manifeste, et repose surtout sur le fait que les spores non neutralisées sont en apparence tuées par des concentrations très faibles. En présence de sérum et sans acide, le bénéfice du défaut de neutralisation disparaît, ou le sérum agit comme la neutralisation. Une fois atteinte la dose élevée qu'il rend nécessaire, la neutralisation au sulfhydrate d'ammonium n'aurait à son tour plus beaucoup d'influence : elle n'obligerait pas à forcer sensiblement la concentration.

Ainsi l'addition d'acide, si elle n'améliore pas sensiblement les résultats, ne peut cependant pas être défavorable. Mais est-il nécessaire d'atteindre la dose élevée de 1 p. 100? La question a une importance pratique. Une usine française a traité avec 1 p. 100 d'acide formique environ 3.000 peaux ; il s'est formé un grain qui dépréciait totalement le cuir, de sorte que l'opération fut jugée désastreuse. Il n'en aurait pas été ainsi avec des concentrations plus faibles. Au point de vue de la stérilisation, y a-t-il une dose optima? Dans les tableaux XIII et XIV, j'ai comparé diverses concentrations en acide formique, à partir et au-dessous de 0.50 pour 100, sur les spores sans et avec sérum.

Sans sérum (XIII), on n'aperçoit pas de différence entre les doses de 0,5 à 0,1 p. 100. Avec sérum (XIV), 0,12 et 0,05 p. 100 se sont montrés inférieurs à 0,25 et 0,5 une fois, et 0,20 à 0,50 une fois. Les concentrations de 0,50 à 0,10 étaient équivalentes

dans les trois autres séries. Le pouvoir antiseptique propre de l'acide ne paraît pas intervenir, et son action dissolvante à l'égard des combinaisons insolubles du mercure être suffisamment assurée avec 0,20 à 0,25 p. 100.

TABLEAU XIII. — **Sans sérum. Doses d'acide formique p. 100.**

CONCENTRATION du sublimé.	SPORES 2 minutes (IV_2).		SPORES 3 minutes (IV_2).		
	0.5	0.1	0.5	0.25	0.125
1 : 2000	+	—	—	—	—
1000	+	—	—	—	—
500	+	—	.	.	.

TABLEAU XIV. — **Avec sérum. Doses d'acide formique p. 100.**

CONCENTRATION du sublimé.	SPORES 30 secondes (Alg. II_1).				SPORES 2 min. (III_5).		SPORES 2 min. (III_5).			SPORES 3 min. (IV_4).			SPORES 3 min. (IV_2).		
	0,5	0,25	0,12	0,05	0.5	0,25	0,5	0,2	0,1	0,5	0,2	0,1	0,5	0.2	0,1
1 : 4000	+	+	+	+											
3000	—	—	—	+											
2000	—	—	—	—	.....	....	—	—	—						
1000	...	....	....	....	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
500	...	....	....	....	—	—	....	....	....	—	—	—	—	+	—
500	...	....	....	...	—	—	...	...	..	...	...	...	—	+	—

En résumé, dans toutes ces expériences, le sublimé, neutralisé cinq minutes dans le sulfhydrate d'ammoniaque à 1,6 p. 100, ne tue pas les spores résistantes à moins de 1 : 300. En présence de concentrations voisines de cette limite, l'addition d'acide ou de sérum est presque indifférente au résultat. Au contraire, lorsque la stérilisation est obtenue avec des concentrations faibles, — que les spores soient particulièrement sen-

sibles ou que la neutralisation soit insuffisante, — ces mêmes facteurs jouent un rôle nettement défavorable, la présence d'acide corrigeant pourtant celle de sérum, qui est la plus nuisible des deux. Si, au voisinage de la dose mortelle, l'action du sublimé n'est pas contrariée par la présence d'acide ou de sérum, cela tient apparemment à ce que la quantité qu'ils inactivent est minime ; la soustraction n'est sensible que pour les concentrations faibles. Ces curieuses relations illustrent le fait dominant : la mort apparente est produite par des traces de sublimé qui adhèrent énergiquement à la spore ; leur affinité n'est balancée que par un excès énorme de sulfure ou d'hydrogène sulfuré, ou par une proportion très élevée d'acide ou de sérum. Mais la mort réelle exigerait des doses véritablement massives.

V

Action du chlore en présence de matières protéiques.

Le chlore est le plus puissant des antiseptiques, et son action sur la peau à dose raisonnable n'est nullement à craindre (Meunier et Seyewetz) (20). Son emploi pour la désinfection des peaux charbonneuses paraissait indiqué.

Le chlorure de chaux, dont le pouvoir désinfectant est dû à l'hypochlorite, à côté d'un peu de chlore libre, a donné de bons résultats à Woronzoff, Winogradoff et Kolesnikoff (21), à Nissen (22), Chamberland et Fernbach (29), Geppert (6). Hilgermann et Marmann (15) viennent d'en faire l'essai pour la stérilisation des boues et des eaux résiduaires de tannerie. Ces derniers auteurs ont constaté une grande irrégularité dans les résultats, parfois bons avec 0,3 p. 100 de chlorure de chaux, parfois mauvais avec 4 p. 100. Ils ignoraient l'observation de Chamberland et Fernbach, que la solution à 1 : 120 est plus active que la solution à 1 : 12 ou 1 : 60. Mais si l'on ne craint pas l'odeur du chlore, qui n'en permettrait pas l'emploi lorsqu'il s'agit de laver des objets ou des murs, on obtient une bien meilleure désinfection avec le chlorure de chaux acidulé, c'est-à-dire que le chlore est beaucoup plus actif que l'hypochlorite correspondant. Ce fait a été déjà constaté par Nissen, Geppert;

dans un essai préliminaire, j'ai vu les mêmes spores résister six heures et vingt-quatre heures à la solution qui, acidulée, les tuait respectivement en dix minutes et deux heures. Je me suis donc borné à essayer le chlore libre.

Les chiffres connus sur l'efficacité du chlore visent tous des désinfections dans un temps très court, et par suite ne renseignent pas sur un traitement de vingt-quatre heures. Ils révèlent du moins une très grande activité. Les spores seraient tuées en deux minutes, avec 0,3 : 1000 (Krönig et Paul) (2); en une minute avec 0,630 : 1000 (Chamberland et Fernbach). Avec 2 : 1000, elles n'infecteraient plus le cobaye après quinze secondes, ni le lapin après cinq secondes (Geppert) (6). Mais Geppert signalait déjà que la pénétration du chlore est faible, et que la présence d'albumine diminue beaucoup son efficacité.

Le moyen le plus pratique de préparer une solution de chlore est d'aciduler la solution de chlorure de chaux, ou celle d'hypochlorite de soude ou de potasse de titre correspondant. Parmi les autres procédés, Graebe a étudié le mélange de chlorate de soude et d'acide chlorhydrique (23 *a*), et celui de permanganate de potasse et d'acide chlorhydrique (23 *b*). Mais les rendements ne sont intéressants que si l'on opère avec l'acide concentré, et les sels solides ou en solution très concentrée. Dans les proportions qui, d'après les chiffres de Graebe, devraient donner 1 gramme de chlore par litre, on n'obtient en diluant les réactifs que le dixième du rendement, et l'acidité nécessaire est encore trop forte pour la pratique. Comme le chlorate de soude n'a qu'un faible pouvoir antiseptique propre (Krönig et Paul), il ne donnait aucune chance de succès, ce que j'ai vérifié. Mais le permanganate de potasse est un désinfectant énergique. Selon Krönig et Paul un mélange de 0,99 p. 100 de MnO^4K et 0,91 p. 100 de HCl tue les spores en deux minutes. Pour la désinfection des mains, une solution à 1 p. 100 de MnO^4K et 0,5 p. 100 de HCl serait supérieure au sublimé à 5 p. 100. Ces concentrations ne pourraient être appliquées aux peaux sans dommage. J'en ai essayé de plus faibles, soit de 0,4 à 5 : 1000 de MnO^4K, avec 0,2 à 2,5 : 1000 de HCl. Les spores, qui résistaient une minute au chauffage, n'ont jamais été tuées. Il ne restait donc à retenir que les hypochlorites; je les ai acidulés avec un léger excès

d'acide formique, dont l'emploi était avantageux pour l'application de la méthode aux peaux. L'hypochlorite de soude et le chlorure de chaux, pour la même teneur en chlore, sont équivalents, comme l'indiquent les exemples suivants :

TABLEAU XV. — **Spores sèches, en présence de sérum.**

	Chlore p. 1000	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
Sp. 1 min. (IV⁴).	Chlorure de chaux.	.	—	+	— —	.....	—
	Eau de Javel.	.	.	—	— —	.....	—
Sp. 2 min. (V¹).	Chlorure de chaux.	.....	.....	—	—	—	—
	Eau de Javel.	.....	.....	—	.	—	—

On voit qu'il n'y a pas d'écart notable entre les deux sources de chlore; je les ai confondues dans le tableau XVI, qui contient les résultats obtenus sur des lamelles de verre, pour des expériences de vingt-quatre heures (à 20 degrés).

Tableau XVI. — Concentrations en chlore p. 1000.

				0,05	0,08	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,8	1
Sans sérum.	1	Spores 3 min.	I_1	....	....	....	....	.....	.....	—			
	2	—	II_2	...	—	—							
	3	—	III_1	—	....	...	—						
Sérum.	1	Spores 1 sec.	VI_1	....	....	....	....	—	—				
	2	1 min.	IV_4	....	....	++	++	+—	— —	....	— —		
	3	—	IV_4	....	....	....	....	.....	— —	....	— —		
	4	—	VII_1	....	....	....	....	+	+	—	+	—	
	5	—	VII_1	....	....	....	....	.....	+—	....	— —		
	6	2 min.	V_1	....	....	....	....	++	+—	....	— —	—	+
	7	—	V_1	....	....	....	....	.....	+—	....	+		—
	8	3 min.	II_2	....	...	+	+	—	—				
	9	—	II_2	....	....	....	....	+— —	— —				
	10	—	I_2	....	....	...	....	+++	++				
	11	—	III_1	....	....	...	....	.....	+	+			

La différence entre les spores nues et recouvertes de sérum était telle que j'ai abandonné le premier groupe, qui ne pouvait conduire à aucune donnée pratique. Dans les essais en présence de sérum, les séries irrégulières sont fréquentes; je les ai fait figurer intégralement dans le tableau; elles relèvent probablement de variations imprévues du titre en chlore, variations sur lesquelles je reviendrai plus loin. La limite à laquelle la stérilisation est atteinte oscille également, même pour des spores de résistance au chauffage comparable (deux et trois minutes), entre 0,3 et 1 : 1000. Ce dernier chiffre me paraissant élevé, j'ai cherché si en abrégeant le temps d'action, pour la même concentration initiale, la désinfection serait moins énergique. La durée des expériences groupées dans le tableau XVII varie de six à vingt-quatre heures. J'avais essayé aussi de mouiller d'abord les spores avec la solution alcaline d'hypochlorite de soude, puis d'aciduler après un certain temps de contact. Ce procédé n'a présenté aucun avantage.

Tableau XVII.

CONCENTRATIONS EN CHLORE p. 1000.	Sp. 1 sec. (VI¹)			Sp. 1 min. (VII¹)				Sp. 2 min. (V¹)		
	8 h.	16 h.	24 h.	6 h.	8 h.	6-8 h.*	24 h.	8 h.	16 h.	24 h.
0,3	....	....	—	+	+	+	+	....	.....	—
0,4	....	—	—	+	+	+	++—	....	.....	++— —
0,5	....	....	....	....	+	+	—			
0,6	—	—	—	+	+—	+	+ —	....	+	+ —
0,8	—	—	—	+	+—	+	———	....	—	———
1	—	—	—	+	+ +	.....	.....	—	——	+ — —
1,2	—	—	....	....	+	.....	.....	—	—	
1,4	—	....	....	....	....	.....	.....	+	—	
1,6	....	....	....	....	....	.....	.....	—		
1,8	....	....	....	....	....	.....	.....	—		

* 2 h. dans l'eau de Javel, non acidulée; 6 h. dans l'eau acidulée.

Les temps choisis sont tous suffisants pour des spores extrêmement fragiles (une seconde à 100 degrés). Pour les

autres, il y a une légère différence entre huit et seize ou vingt-quatre heures; l'écart entre ces deux dernières durées est masqué par l'irrégularité des résultats; il paraît minime. D'après ces quelques données, les limites de doses et de temps n'étaient pas convenablement choisies pour faire apparaître une relation telle que celle que Gegenbauer et Reichel (19) ont mise en lumière pour l'acide chlorhydrique. Il est probable que, si cette relation existe, elle ne se vérifierait que pour des temps très courts et des doses très élevées; les pertes en chlore jouent un trop grand rôle dès que l'expérience se prolonge.

La neutralisation du chlore à l'hyposulfite de soude n'a pas d'influence bien nette, fait déjà constaté par Geppert. Les propriétés du sublimé à cet égard ont un caractère tout à fait exceptionnel. Dans l'expérience suivante, la plus grande efficacité se manifeste après la neutralisation :

		Cl p. 1000		
		0.4	0.6	0.8
Spores, 1 min. (VII_4).	Neutralisé.	—	—	—
	Sans neutraliser.	+	—	—

Expériences sur des peaux. — La diminution considérable du pouvoir antiseptique du chlore en présence de sérum faisait prévoir que la désinfection des peaux de cobaye ne serait possible qu'avec des concentrations élevées. En effet, tous les essais sont restés négatifs, pour l'inoculation comme pour les cultures, au-dessous de la dose de 1 : 1000. D'après les indications des expériences sur les lamelles, j'ai cherché alors à diminuer le temps d'action. En huit heures, la peau n'était pas désinfectée. Dans une expérience, elle l'était en seize heures; mais dans deux autres essais, j'ai obtenu après seize heures, une inoculation positive sur trois. Ainsi la concentration de 1 : 1000 pendant vingt-quatre heures est une limite au-dessous de laquelle on ne peut guère descendre. Les résultats sont réunis dans le tableau XVIII.

Comment faut-il interpréter ces données? D'après Meunier et Seyewetz (20), la gélatine fixe environ 0,25 à 0,40 p. 100 de son poids sec de chlore; la peau doit se comporter à peu près de la même façon. En immergeant 1 kilogramme de peau séchée (contenant encore 25 p. 100 d'eau par exemple) dans

cinq litres de liquide, elle fixerait 1,80 à 3 grammes de chlore; sur une solution à 1 : 1000, il en resterait 0,640 à 0,400 : 1000. Mais il faut tenir compte aussi de la déperdition très rapide du chlore. Dans un vase à large ouverture, le titre d'un litre de solution de chlore à 1 : 1000 tombe à 0,750 — 0,700 en deux ou trois minutes, 0,650 — 0,500 en cinq minutes, 0,250 en dix minutes.

TABLEAU XVIII.

Nos	PEAU	Cl p. 1000.		DURÉE en heures.	INOCULÉ au bout de :	RÉSULTATS I	II	III	CULTURES
1	Ic.	0,30	Chlorure de chaux.	24	6 jours.	+	+		3 cultures positives.
2	Ic.	0,35	Chlorure de chaux.	24	6 —	+	+	+	3 cultures positives.
3	Ia.	0,40	Chlorure de chaux.	24	3 —	+	+		3 cultures positives.
4	Ia.	0,60	Chlorure de chaux.	24	3 —	+	+		3 cultures positives.
5	Ia.	0,80	Chlorure de chaux.	24	3 —	+	+		3 cultures positives.
6	Ia.	1 »	Chlorure de chaux.	24	30 —	—	—	—	»
7	Ib.	1 »	Eau de Javel,	8	6 —	+	+	+	1 culture positive.
8	Ib.	1 »	Eau de Javel.	16	2 —	—	—	—	»
9	IV.	1 »	Eau de Javel, 24 h., puis acidulé.	16	2 —	+	—	—	»
10	IV.	1 »	Ac. formique, 24 h., puis eau de Javel.	16	2 —	+	—	—	1 culture positive.

La présence de peau (250 grammes de peau humide pour un litre) provoque une chute un peu plus rapide, par exemple 0,600-0, 450 en deux minutes; mais après dix minutes, j'ai trouvé des chiffres de 0,225-215, presque les mêmes que dans les vases sans peau. Il est clair que ces dosages ne peuvent être qu'approximatifs, la déperdition variant beaucoup d'un essai à l'autre. Après vingt-quatre heures, il restait, en présence de peau, de 0,017 à 0,035 : 1000. En augmentant la concentration initiale jusqu'à 2 : 1000, la perte est proportionnellement plus forte; le titre après quelque temps n'est guère différent de celui qu'on obtient avec 1 : 1000. Ainsi deux facteurs, fixation du chlore sur les matières protéiques, et déperdition par diffusion du gaz, concourent à abaisser le titre des

solutions, et l'importance du second paraît dépasser celle du premier. Il serait donc légitime de viser à des désinfections rapides, et par suite d'augmenter les doses plutôt que les temps de contact. On a vu cependant que pour la même concentration la différence entre six, huit et seize heures, était appréciable; au delà l'influence de la durée est moins sensible. La conclusion de ces expériences est que la dose de chlore libre ou actif qui est nécessaire pour stériliser est très faible, peut-être 0,2 ou 0,1 : 1000, en prolongeant l'action. Mais il est difficile de fixer à l'avance les conditions qui permettront de réaliser cette concentration. Serait-il donc possible de stériliser de grosses peaux par le chlore? On ne saurait en douter *a priori*. L'expérience pourrait seule trancher la question; elle vaudrait d'être tentée si l'occasion de traiter de grosses peaux naturellement infectées se présentait. J'ai indiqué ailleurs comment l'opération devrait être conduite.

Conclusions. — Une autre méthode, proposée par Schattenfroh (24) et soigneusement étudiée par Gegenbauer et Reichel (19) repose sur l'emploi de l'acide chlorhydrique, avec addition de chlorure de sodium, qui préserve les peaux d'une attaque sérieuse par l'acide. On obtient une désinfection efficace à condition de pousser suffisamment soit la concentration soit le temps de contact; les combinaisons les plus pratiques sont : 2 p. 100 d'acide (titre réel) avec 10 p. 100 de sel, et quarante-huit heures, à la température de 15 degrés à 20 degrés; ou 1 p. 100 d'acide avec 10 p. 100 de sel, et six heures, à 40 degrés. Malheureusement les peaux auraient peine à sortir indemnes de ce traitement. Si l'on réduit l'un des facteurs, la méthode, sans être dépourvue de valeur, donne moins de sécurité que l'emploi du chlore ou du sublimé. Avec le chlore on réussit à stériliser des peaux de cobaye dans des conditions parfaitement acceptables pour la pratique; les résultats seraient-ils les mêmes avec des peaux plus épaisses? Une certaine irrégularité dans la désinfection est à craindre; l'odeur aussi peut être un inconvénient, lorsqu'on opérerait en grand. Enfin, la méthode au sublimé-acide formique est très satisfaisante au point de vue de la tannerie, si l'on abaisse à 2 : 1000 la dose d'acide formique. Mais en dépassant la concentration de

1 : 5000 de sublimé, on risquerait de voir apparaître sur les peaux des taches persistantes de sulfure de mercure. Il faudrait donc se contenter d'une concentration qui, sans tuer les spores, les rendît presque toutes inoffensives, à la condition d'éviter les préparations de sulfures susceptibles de neutraliser le sublimé. Le nombre des cas annuels de charbon dans l'industrie des cuirs et peaux en France peut être estimé à 40 ou 50 environ. L'expérience nous dirait à quel chiffre, sans doute très bas, il serait abaissé par la pratique d'une semblable désinfection.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. G. Abt. — *Bull. de la Soc. d'Encouragement pour l'Industrie nationale*, août-octobre 1913, p. 248.
2. Krönig et Paul. — *Zeitschr. f. Hygiene*, t. XXV, p. 1, 1897; et *Zeitschr. f. Physikal. Chem.*, t, XXXI, p. 3, 1896.
3. V. Esmarch. — Die desinficierende Wirkung des strömenden überhitzten Dampfes. *Zeitschr. f. Hygiene*, t. IV, p. 197, 1888; et Die Milzbrandsporen als Testobject bei Prüfung von Desinficienten. *Zeitschr. f. Hygiene*, t. V, p. 67, 1889.
4. Dannapfel. — Dissert. inaugur. Königsberg, 1899; Refer. *Centralbl. f. Bakter.*, t. VI, p. 841, 1900.
5. Otsuki. — Dissert. inaugur. Halle, 1899.
6. Geppert. — a) *Deutsche Medic. Wochenschr.*, p. 826, 1891; b) *Berlin. Klin. Wochenschr.*, nos 36-37, 1889 et no 11, 1890; *Deutsche Medic. Wochenschr.*, p. 797, 826, 1065; 1891.
7. Weil. — Künstliche Herstellung von Sporenmaterial von einem bestimmten Resistenzgrade gegen strömenden Dampf. *Centralbl. f. Bakter.*, t. XXX, p. 500 et 526, 1901.
8. Osborne. — *Archiv f. Hygiene*, t. XI, p. 51, 1890.
9. Chamberland et Fernbach. — La désinfection des locaux. *Annales de l'Institut Pasteur*, juin 1893, p. 433.
10. Croner et Neumann. — *Deutsch. Medic. Wochenschr.*, 1911, p. 1784.
11. Ottolenghi. — *Desinfection*, t. II, p. 105, 1909; t. III, p. 73, 1910; t. IV, p. 65 et 113, 1911.
12. Schnuerrer. — a) Zur Frage der Häutedesinfection. *Tierärztl. Zentralbl.*, 1911, p. 443; b. *Gerber*, 15 janv. 1913, no 921, p. 17.
13. Sevcik. — Exper. Beitr. zur Frage der Desinfect. Milzbrandsporenhaltiger Häute u. Felle. *Zeitschr. f. Infectionskrankh der Haustiere*, t, XIII, p. 323, 1913.
14. Moegle. — *Centralbl. f. Bakter.*, Origin. I, t. LXVI, p. 442, 1912.
15. Hilgermann et Marmann. — Untersuchungen über die durch Gerbereien verursachten Milzbrandgefahren u. ihre Bekämpfung. *Archiv f. Hygiene*, t. XXIX, 4 et 5, p. 168, 1913.

15 *bis*. C. Ponder. — *A report to the worshipful company of Leathersellers*, 1911.

16. Behring et Nocht. — *Bekämpfung der Infectionskrankh.* Leipsig, 1894; et Ueber Desinfection, *Zeitschr. f. Hygiene*, t. IX, p. 443, 1890.
17. Rohrkoff. — Thèse, Saint-Pétersbourg, 1897; in *Rev. d'Hygiène publ. et de police sanitaire*, 1897, p. 738.
18. Paul, Birstein et Reuss. — *Biochem. Zeitschr.*, t. XXIX, p. 202, 1910.
19. Gegenbauer et Reichel. — Die Desinfection milzbrandhaltig. Häute u. Felle in Salzsaüre-Kochsalz Gemisch. *Archiv f. Hygiene*, t. LXXVIII. p. 1, 1913.
20. Meunier et Seyewetz. — Action du chlore sur la gélatine et sur la peau. *Le Cuir*, 1911, p. 389, 675; *Collegium*, 1911, p. 289, 373.
21. Woronzoff, Winogradoff et Kolesnikoff. — *Centralbl. f. Bakter.*, t. I, p. 641, 1887.
22. Nissen. — *Zeitschr. f. Hygiene*, t. VIII, p. 62, 1890.
23. Graebe. — a) *Berichte Deutsch. Chemisch. Gesellsch.*, t. XXXIV, p. 645, 1901; b) *Ibid.*, t. XXV, p, 43, 1902.
24. Schattenfroh. — *Wiener Klin. Wochenschr.*, t. XXIV, p. 735, 1910.

LÉSIONS DU SYSTÈME NERVEUX DANS L'INTOXICATION VERMINEUSE

par A. RACHMANOW.

(Travail du laboratoire de M. Weinberg, à l'Institut Pasteur.)

Les cliniciens ont observé depuis longtemps un certain nombre de symptômes nerveux, parfois très graves, chez des sujets infectés par les helminthes ; il n'existe cependant pas de description anatomo-pathologique des lésions nerveuses chez l'homme ou les animaux ayant succombé à une helminthiase. D'ailleurs, on a très rarement l'occasion de faire l'autopsie d'un sujet dont la mort serait uniquement due à une intoxication vermineuse ; le plus souvent, cette dernière se complique d'une infection secondaire. Dans ces conditions, il est difficile, lors de l'interprétation des lésions observées, de faire la part de chacun des facteurs morbides.

Nous avons pensé que, seule, l'étude du système nerveux dans l'intoxication vermineuse expérimentale pourrait déterminer si les toxines sécrétées par les helminthes sont vraiment capables de provoquer la formation de lésions nerveuses, et jusqu'à quel point les symptômes nerveux, observés chez l'homme et les animaux porteurs d'helminthes, peuvent être mis sur le compte de l'action de ces derniers.

Nous avons fait trois séries d'expériences. Dans la première, nous avons examiné le système nerveux central dans l'intoxication directe ; la deuxième a trait à l'intoxication vermineuse indirecte, c'est-à-dire à l'anaphylaxie vermineuse ; enfin, la troisième partie de nos expériences se rapporte à l'état du système nerveux dans l'anaphylaxie sérique. Nous avons pratiqué ces dernières recherches, afin de voir si les lésions observées dans l'anaphylaxie vermineuse ont un caractère spécial ou bien si elles se retrouvent également chez les

animaux ayant présenté des accidents anaphylactiques analogues, mais après sensibilisation par d'autres substances.

Avant d'aborder l'exposé de nos recherches, remarquons que la seule indication de lésions nerveuses dues aux toxines vermineuses, que nous ayons trouvée dans la littérature, se trouve dans le travail de Messineo (1). La constatation de cet auteur n'a cependant, nous semble-t-il, aucune valeur, car elle a été faite à la suite d'injection sous-dure-mérienne de liquide ascaridien, c'est-à-dire dans des conditions qui ne peuvent se présenter dans la réalité que d'une façon tout à fait exceptionnelle.

I

LÉSIONS DU CERVEAU ET DE LA MOELLE ÉPINIÈRE DANS L'INTOXICATION VERMINEUSE DIRECTE

Dans cette première partie du travail, nous avons étudié 13 cobayes dont 6 ont été intoxiqués par le liquide péri-entérique de l'*Ascaris megalocephala*, 5 par l'extrait de *Tænia plicata* du cheval et 2 par l'extrait de sclérostomes (cheval).

a) Les injections de toxine ascaridienne étaient sous-cutanées et quotidiennes.

Le cobaye **1** a reçu deux injections de 1 cent. cube d'une dilution de toxine à 1/20. Il a présenté, dès le lendemain de la première injection, de la parésie du train postérieur et est mort en 36 heures.

Le cobaye **2** a été injecté 6 fois avec 0,5 cent. cube d'une dilution de toxine à 1/50 ; il n'a présenté, comme signe clinique, que de l'abattement. Le même symptôme a été trouvé chez les cobayes 3, 4 et 6, auxquels on a fait 20, 29 et 80 injections. On n'a observé rien de pathologique chez le cobaye 5, qui a été cependant injecté 70 fois. Tous ces cobayes ont été sacrifiés, excepté le premier, dont les organes ont été fixés aussitôt après sa mort.

b) Les injections de téniotoxine ont été également quotidiennes, mais les voies d'injection et les doses étaient variables.

Le cobaye **7** a reçu en injection intraveineuse 4 cent. cubes d'une dilution à 1/25 d'extrait de *Tænia plicata*; mort en 15 heures. Les cobayes 8 et 9 qui ont été traités de la même façon et ont présenté de la parésie du train postérieur comme le cobaye 7, ont survécu et ont été sacrifiés le lendemain, un 17 et l'autre 24 heures après l'injection.

Le cobaye **10** a reçu 29 injections sous-cutanées et quotidiennes de 0,5 cent.

(1) *Giornale med. del. R. Esercito*, avril 1805.

cube d'une dilution à 1/5 de téniotoxine ; cet animal supportait mal les injections ; son poids est tombé de 420 à 320 grammes.

Le cobaye **11** a bien supporté les 30 premières injections (0,5 cent. cube d'une dilution à 1/25) ; mais il est devenu très faible et a beaucoup maigri, lorsqu'on a commencé à lui injecter des doses croissantes de toxine (de 1/2 cent. cube d'une dilution à 1/25 à 3 cent. cubes d'extrait pur). On lui a fait en tout 68 injections quotidiennes.

c) Les cobayes **12** et **13** ont reçu en injection intraveineuse 0,5 cent. cube d'extrait de sclérostomes dilué de moitié dans l'eau physiologique. L'un a été sacrifié au moment de l'agonie, 5 heures après l'injection ; il a été paralysé pendant les deux dernières heures. Le deuxième a présenté de la parésie du train postérieur ; il a été sacrifié également 5 heures après l'injection.

Technique histologique. — Les morceaux prélevés au niveau de la région motrice du cerveau et à différentes hauteurs de la moelle épinière ont été fixés, les uns par l'alcool à 96 degrés, les autres par le liquide de Weigert pour la neuroglie et, enfin, par le formol à 10 p. 100. Les coupes, provenant des morceaux fixés par l'alcool et inclus dans la celloïdine, ont été colorées par le bleu de méthylène d'Unna pour la mise en évidence des corpuscules de Nissl, et par la méthode de Rachmanow à l'argent réduit pour l'étude des neurofibrilles.

Les morceaux fixés par le Weigert ont été coupés par le procédé de la congélation ; les coupes ont été colorées par l'hématoxyline phospho molybdique de Mallory (Alzheimer), ou bien par le mélange bleu d'aniline-orange de Mallory (Alzheimer-Jakob).

Les pièces fixées au formol ont été également coupées au microtome à congélation ; les coupes ont été colorées au Sudan III, au rouge Scharlach ou bien à l'argent réduit de Bielschowsky.

Les cobayes se comportent d'une façon bien différente vis-à-vis de la toxine vermineuse ; les uns supportent très bien de nombreuses injections, sans présenter le moindre symptôme clinique ; d'autres, comme nous venons de le voir, s'affaiblissent, maigrissent et sont pris d'une grande faiblesse qui les empêche parfois de faire le moindre mouvement. Nous n'avons trouvé de lésions du système nerveux central que chez les cobayes ayant mal supporté l'absorption de toxine vermineuse. Ces lésions sont d'autant plus marquées, que la durée des symptômes a été plus longue.

Nous trouvons inutile de décrire les constatations histologiques faites lors de l'analyse de chaque cas ; cela nous entraînerait à des répétitions inutiles. Nous donnerons donc une description générale des lésions observées.

Examinées à un faible grossissement, les coupes de moelle et de cerveau montrent presque toujours une congestion, surtout marquée au niveau des méninges. Lorsque les lésions sont très

intenses, on peut aussi constater à ce grossissement un certain degré de neurophagie. Mais les lésions vraiment nettes ne sont observées qu'à l'immersion.

En général, lorsqu'on trouve des lésions, ces dernières ne sont pas localisées à un point quelconque de la moelle épinière, mais se retrouvent sur toute la hauteur de cet organe ; il en est de même pour toute l'épaisseur de la région motrice de l'écorce cérébrale (1).

Nous allons décrire successivement les lésions de la cellule nerveuse, de la cellule neuroglique et de la fibre de la substance blanche.

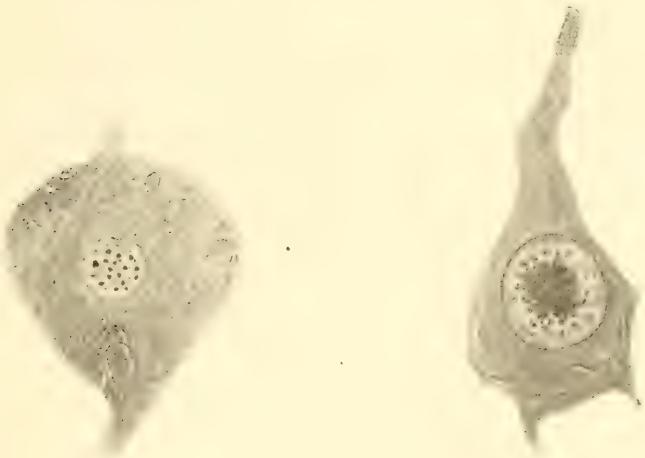
Lorsque les lésions sont légères, la cellule nerveuse montre seulement un début de chromatolyse ; les corpuscules de Nissl sont encore reconnaissables, mais leurs contours sont moins nets et l'on trouve déjà un grand nombre de granulations bleuâtres, fines, qui viennent s'interposer entre ces corpuscules. Dans les cas plus graves, ces granulations remplissent uniformément tout le protoplasma de la cellule nerveuse, dans laquelle on ne voit plus de corpuscules de Nissl. Quelquefois, ces granulations sont tellement serrées qu'elles rendent la cellule très opaque. Dans d'autres cas, elles se groupent de façon à former un vaste reticulum enserrant toute la cellule.

Au fur et à mesure que les corpuscules de Nissl s'altèrent et se détruisent, on voit apparaître dans le protoplasma des cellules nerveuses, aussi bien dans la moelle épinière que dans le cerveau, des canaux sinueux, comme ceux que montre la figure 1. Ces canaux sont tantôt limités à un coin de protoplasma, tantôt disséminés dans toute son épaisseur. Dans certaines préparations il nous a semblé voir que ces canaux débouchent à l'extérieur de la cellule, comme on peut très bien s'en rendre compte d'après le dessin 4 de notre planche en couleur. Il n'est pas douteux que la présence de ces canaux n'est pas due à un artifice de préparation ; on les voit sur les coupes provenant de morceaux fixés par différents liquides fixateurs, et colorées aussi bien par le bleu d'Unna que par l'hématoxyline de Mallory.

(1) Nous n'avons recherché des lésions que dans la partie motrice du cerveau.

Il nous est impossible de dire si ces canaux, qui ressemblent beaucoup à ceux connus sous le nom de canaux d'Holmgren, sont des formations pathologiques, ou si leur existence dans la cellule normale est masquée par les corpuscules de Nissl. Quoi qu'il en soit, leur présence témoigne d'un état pathologique de la cellule nerveuse.

Cela est d'autant plus vraisemblable qu'une altération ana-



1 2

Fig. 1. — Cellule nerveuse de la corne antérieure de la moelle épinière d'un cobaye intoxiqué par l'extrait de sclérostomes. Coloré par l'hématoxyline phospho-molybdique de Mallory ; objectif à immersion 1/12 de Zeiss, oculaire 2.

La cellule montre des canaux sinueux disséminés dans différents points de son protoplasma.

Fig. 2. — Mêmes détails dans une cellule pyramidale de l'écorce cérébrale d'un cobaye mort en crise d'anaphylaxie hydatique. Même coloration : objectif à immersion 1/12, oculaire 4.

logue de la cellule nerveuse a été décrite déjà en 1908 par Nageotte et Ettlinger (1) dans les diverses intoxications et auto-intoxications expérimentales, en particulier chez les chiens ayant subi une extirpation double des capsules surrénales ou des reins, et chez le cobaye intoxiqué par le venin de la vipère, la toxine tétanique ou l'iodure de potassium. Les dessins que

(1) Nageotte et Ettlinger, Lésions des cellules nerveuses au cours de diverses intoxications et auto-intoxications. *Presse médicale*, 23 mars 1898, n° 25.

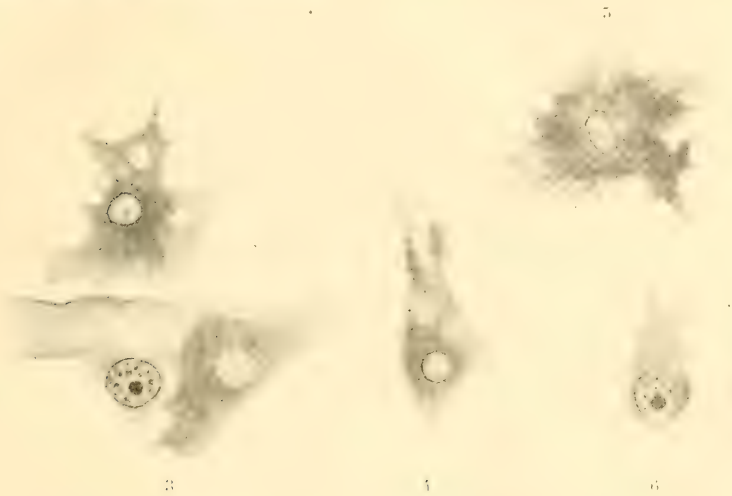
nous trouvons dans leur travail montrent l'identité des lésions observées par eux avec celles que nous venons de décrire et que Nageotte et Ettlinger désignent sous le nom de fissuration de la cellule nerveuse. Des lésions semblables ont été également décrites par Marchand et Vurpas (1) sous le nom de lésions « en coup d'ongle » dans un cas de méningomyélite expérimentale chez un chat.

Les neurofibrilles restent intactes tant que la cellule nerveuse est légèrement atteinte; on peut encore les reconnaître, même lorsque les corpuscules de Nissl ont disparu et que les fines granulations bleuâtres forment un reticulum dans le protoplasma. Cependant, dans ces cas, les neurofibrilles sont beaucoup plus fines que dans la cellule normale (procédé de Rachmanow). Les neurofibrilles disparaissent complètement dans les cas d'intoxication grave. Dans ces conditions, on voit aussi des modifications notables du noyau, qui se déplace à la périphérie de la cellule, se ratatine et montre quelquefois un nucléole déformé. La déformation du noyau peut coïncider avec la déformation du protoplasma, comme le montre la figure 3 de la planche qui représente une grande cellule pyramidale de l'écorce cérébrale dans un cas d'intoxication chronique par la téniotoxine. On voit que la cellule est ratatinée et qu'un de ses prolongements est tortueux, en tire-bouchon.

Lorsqu'on examine une préparation de moelle ou de cerveau d'un cobaye intoxiqué, colorée par le bleu d'Unna, on constate que les noyaux des cellules neurogliques sont beaucoup plus apparents que dans les coupes de cerveau ou de moelle normaux. Cela tient à l'altération d'un grand nombre de ces cellules dont les noyaux sont devenus pycnotiques. Mais la pycnose du noyau n'est que le premier pas vers la transformation « amiboïde » de la cellule neuroglique, comme l'ont déjà constaté Alzheimer et plus récemment Rosental. On trouve la pycnose des noyaux neurogliques dans toutes les intoxications, légères ou intenses. Le stade « amiboïde » typique ne s'observe que dans les cas graves. Les figures 3 à 6 montrent les différents aspects de la cellule neuroglique ayant pris la forme

(1) Marchand et Vurpas, Lésions de la moelle dans un cas de méningomyélite expérimentale chez un chat. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 9 mars 1901.

« amiboïde », telle que l'a décrite Alzheimer et telle que nous l'avons retrouvée dans différents cas d'intoxication directe, ainsi que dans l'anaphylaxie. Le plus souvent, son noyau est transparent et le protoplasma renferme une ou plusieurs vacuoles et présente de nombreux prolongements rappelant ceux des cellules amiboïdes.



Les figures 3, 4, 5 et 6 montrent les différents aspects sous lesquels se présentent les cellules neurogliques ayant subi la transformation amiboïde. Dans le dessin 3, on voit deux cellules neurogliques, dont une appliquée sur les parois d'un capillaire sanguin, e une cellule neuroglique normale.

Comme la figure précédente, la figure 4 montre une cellule neuroglique amiboïde de la substance blanche de la moelle épinière d'un cobaye mort d'anaphylaxie hydatique aiguë.

La figure 5 montre une cellule neuroglique amiboïde de la substance grise de la moelle épinière du même cobaye.

La figure 6 montre une cellule neuroglique amiboïde de la substance blanche (région sous-corticale) d'un cobaye mort en crise d'anaphylaxie hydatique.

Toutes ces figures sont dessinées d'après les préparations colorées à l'hématoxyline phospho-molybdique de Mallory (Alzheimer) ; objectif à immersion 1/12 de Zeiss, oculaire 4.

Dans certains cas, on constate une accumulation de cellules neurogliques autour des cellules nerveuses, ce qu'on interprète habituellement comme phénomène de neurophagie. Nous n'avons cependant jamais observé de substances lipoïdes dans le protoplasma de ces cellules neurogliques, ni dans la paroi des vaisseaux.

On trouve également des modifications très nettes des fibres de la substance blanche; elles sont tuméfiées et montrent au niveau de leur cylindraxe, sur les coupes colorées par la méthode de Mallory, des granulations tantôt roses, tantôt bleuâtres.

Remarquons enfin que nous n'avons jamais trouvé de lésions appréciables au niveau de la pie-mère.

II

LÉSIONS DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL DANS L'ANAPHYLAXIE VERMINEUSE

Nous avons voulu nous rendre compte si les accidents d'anaphylaxie vermineuse provoquent également des lésions du système nerveux; le tableau I résume les 19 cas que nous avons étudiés.

Cette étude nous a permis de constater tout d'abord qu'il est le plus souvent impossible de déceler, dans le cerveau ou dans la moelle, la moindre lésion (par la technique histologique moderne) chez les animaux n'ayant présenté que des phénomènes anaphylactiques très légers ou bien, au contraire, ayant succombé au choc anaphylactique mortel, mais d'une très courte durée (trois à dix minutes).

Les lésions nerveuses sont, par contre, très marquées, lorsque l'animal a présenté des accidents anaphylactiques graves, pendant au moins une demi-heure. L'intensité de ces lésions est d'autant plus grande que la durée des accidents graves (convulsions, paralysie, parésie du train postérieur, etc.) a été plus longue. Les figures en noir (2, 4, 5, 6) et certaines figures (1, 2, 5) de la planche en couleur montrent très nettement que les lésions des cellules nerveuses, des cellules neurogliques et des fibres nerveuses, dans l'anaphylaxie vermineuse, présentent les mêmes caractères que dans les cas où l'intoxication directe par les produits parasitaires était d'une certaine gravité.

Il est à noter que la nature des lésions ne dépend nullement de l'espèce parasitaire à laquelle appartient l'helminthe qui a fourni la toxine ; les lésions sont les mêmes dans l'anaphylaxie hydatique et dans l'anaphylaxie ascaridienne. Nous avons même

TABLEAU I. — **Observations d'anaphylaxie vermineuse.**

NUMÉRO des expériences	NUMÉRO des cobayes	DATE de l'injection sensibilisante	PRODUITS vermineux injectés		DATE de l'injection déchaînante	DOSE de l'épreuve déchaînante	PHÉNOMÈNES ANAPHYLACTIQUES observés
			Liquide hydatique	Toxine ascaridienne			
1	24	30 juin 1913	2 cc.	—	24 juil. 1913	2 cc.	Très légers.
2	25	Id.	2 cc.	—	Id.	2 cc.	Très légers.
3	20	Id.	2 cc.	—	Id.	2 cc.	Toux, convulsions, mort en 4 min.
4	27	18, 22. 26 avril 1913	3 inject. de 2 cc. à 4 jours d'intervalle.	—	25 juil. 1913	2 cc.	Toux, convulsions, mort en 3 min.
5	34	25 juil. 1913	3 cc.	—	4 sept. 1913	3 cc.	Tremblements, tombé au bout de 5 min., mort en 10 min.
6	29	Id.	3 inject. de 2 cc. à 4 jours d'intervalle.	—	25 juil. 1913	2 cc.	Toux, convulsions, paralysie du train postérieur pendant 15 min.; s'est remis ensuite, sacrifié au bout de 8 heures.
7	28	Id.	Id.	—	Id.	2 cc.	Mêmes phénomènes que dans le cas précédent pendant 10 min.; rémission, sacrifié au bout de 2 heures.
8	23	30 juin 1913	2 cc.	—	24 juil. 1913	2 cc.	Toux, convulsions, paralysie du train postérieur pendant 15 min.; sacrifié au bout d'une heure.
9	37	25 juil. 1913	2 cc.	—	4 sept. 1913	2 cc.	Dyspnée, abattement pendant 36 min.; sacrifié au bout de 3 heures.
10	26	26 avril 1913	8 inject. quotidiennes de 1/4 cc.	—	24 juil. 1913	5 cc. péritoine.	Malade au bout de 3 heures, abattement et paralysie des membres pendant 1 heure; sacrifié en pleine crise.
11	35	25 juil. 1913	3 cc.	—	4 sept. 1913	3 cc.	Toux, convulsions au bout de 3 min.; mort après 36 min.
12	38	Id.	3 cc.	—	Id.	3 cc.	Hoquets, tombe au bout de 5 min., paralysie du train postérieur; reste couché pendant 1 heure; sacrifié 2 heures après, au moment de la rémission.
13	33	Id.	3 cc.	—	Id.	3 cc.	Dyspnée, toux, hoquets pendant 5 min., reste abattu et immobile pendant 50 min. au bout desquelles il est sacrifié.
14	13	21 juin 1913	3 inject. de 2 cc. à 4 jours d'intervalle.	—	25 juil. 1913	2 cc.	Abattement, secousses convulsives pendant 1 heure.
15	14	25 juil. 1913	3 cc.	—	4 sept. 1913	2 cc.	Id.
16	15	Id.	3 cc.	—	Id.	2 cc.	Id.
17	16	28 avril 1913	—	0,5 cc. au 1/50	1er juin 1913	0,5 cc.	Mort en 3 min.
18	12	Id.	—	Id.	Id.	0,5 cc.	Mort en 3 min.
19	11	Id.	—	1/5 cc. au 1/50	Id.	2 cc. à 1/50	Mort en 5 min.

constaté que les lésions de l'anaphylaxie vermineuse n'ont rien de spécial et qu'elles sont absolument superposables à celles qu'on trouve dans l'anaphylaxie sérique. Le tableau II résume les observations de nos cobayes sensibilisés par le sérum de cheval, et chez lesquels nous avons provoqué des accidents graves d'une certaine durée. Lorsque le cobaye est sacrifié quelques heures après s'être rétabli d'une crise d'anaphylaxie grave, on trouve chez lui des lésions beaucoup moins importantes que chez les sujets sacrifiés pendant une crise d'intensité semblable. Ce fait nous permet de penser que la cellule nerveuse se répare rapidement, lorsque l'animal a supporté le choc anaphylactique.

TABLEAU II. — **Observations d'anaphylaxie sérique.**

NUMÉRO des expériences	NUMÉRO des cobayes	DOSE de l'injection sensibilisante	DOSE injectée	DATE de l'injection déchaînante	DOSE injectée (veine)	PHÉNOMÈNES anaphylactiques observés
1	32	9 sept. 1913	1 cc. à 1/50	4 sept. 1913	1/40 cc.	Toux, dyspnée, secousses violentes pendant 8 min., remis en 10 min.; sacrifié au bout de 15 min.
2	31	Id.	1 cc. à 1/50	Id.	1/40 cc.	Démangeaisons, convulsions au bout de 5 min., parésie du train postérieur pendant 5 min.; sacrifié au bout de 13 min.
3	30	Id.	1 cc. à 1/50	2 sept. 1913	1/16 cc.	Toux, parésie du train postérieur pendant 30 min., reste abattu; sacrifié au bout de 1 heure.
4	39	Id.	1 cc. à 1/50	8 oct. 1913	1/8 cc.	Dyspnée, secousses, paralysie du train postérieur, abattement; sacrifié au bout de 25 min.
5	40	Id.	1 cc. à 1/50	Id.	1/8 cc.	Convulsions, puis parésie du train postérieur pendant 15 min., très malade pendant 40 min., sacrifié au bout de 40 min.

Dans un mémoire tout récent, paru au moment où notre travail était presque terminé, Rosental a décrit des lésions

qu'il a observées dans quelques cas d'anaphylaxie sérique. A quelques détails près, les résultats de ses recherches concordent avec les nôtres (1).

Conclusions.

1° Le système nerveux central du cobaye ne réagit pas toujours à l'intoxication vermineuse. On ne trouve chez cet animal de lésions nerveuses que dans le cas où il a présenté de son vivant des symptômes cliniques plus ou moins graves. Certains individus peuvent résorber des quantités considérables de produits vermineux, sans donner lieu à une réaction nerveuse tant soit peu marquée.

2° Les lésions qu'on observe dans l'intoxication aiguë ou subaiguë portent sur la cellule nerveuse, la cellule neuroglique et sur la fibre de la substance blanche. En dehors des différents degrés de chromatolyse, la cellule nerveuse présente souvent un nombre considérable de canaux sinueux creusés dans toute l'épaisseur ou dans une partie de son protoplasme. Dans les cas graves, le noyau se déplace à la périphérie de la cellule et montre un nucléole déformé. Les neurofibrilles sont conservées dans les formes légères d'intoxication, mais disparaissent dans les cas graves.

La cellule neuroglique présente les différents stades de la transformation « amiboïde » : ou bien elle conserve sa forme, mais son noyau devient pycnotique, ou bien elle prend l'aspect de la cellule amiboïde d'Alzheimer. On trouve également, surtout dans certains cas d'intoxication chronique, une accumulation anormale d'éléments neurogliques autour des cellules nerveuses (phénomène de la « neurophagie »). Dans les mêmes conditions, les fibres de la substance blanche sont également altérées ; elles sont tuméfiées, mais de façon irrégulière.

3° Les lésions du cerveau et de la moelle épinière dans l'anaphylaxie vermineuse sont nulles ou à peine marquées, si le cobaye meurt de choc anaphylactique suraigu, en 3-10 minutes. Elles sont, par contre, très accusées, si les phénomènes

(1) S. Rosental, Experimentelle Studien über amöboide Umwandlung der Neuroglia. *Histologische und histopathologische Arbeiten über die Grosshirnrinde*. Nissl-Alzheimer. Vol. VI, fasc. 1, p. 89-160.

anaphylactiques graves ont été d'une certaine durée (une demi-heure ou plus). Elles présentent les mêmes caractères que dans le cas d'intoxication subaiguë ou chronique. Il existe presque toujours un parallélisme entre la durée des accidents graves et l'intensité des lésions de la cellule nerveuse.

4° Les lésions du système nerveux central, observées chez les animaux anaphylactisés avec le sérum de cheval, sont tout à fait superposables à celles trouvées dans l'anaphylaxie vermineuse.

5° Comme les lésions du système nerveux sont beaucoup plus marquées et de beaucoup plus fréquentes dans l'anaphylaxie vermineuse que dans l'intoxication directe par les toxines parasitaires, il nous paraît probable que les phénomènes nerveux, parfois très intenses, comme par exemple les symptômes de méningisme que l'on observe quelquefois chez certains porteurs d'helminthes, doivent être considérés comme étant de nature anaphylactique.

EXPLICATION DE LA PLANCHE

Toutes les figures sont dessinées à la chambre claire de Zeiss; objectif à immersion de Zeiss 1/12; pour les dessins 1 et 2, on s'est servi de l'oculaire 2; pour les dessins 3, 4, 5 et 6, de l'oculaire 4. Les coupes ont été colorées au bleu de méthylène d'Unna.

1° Groupe de cellules nerveuses de la corne antérieure de la moelle épinière provenant d'un cobaye sacrifié en pleine crise d'anaphylaxie hydatique (obs. n° 15). On y voit trois cellules nerveuses, dont une entourée par des cellules neurogliques. Les cellules nerveuses sont en « chromatolyse »; le protoplasme ne montre plus de corpuscules de Nissl, mais il est parsemé de fines granulations prenant une teinte bleuâtre au bleu d'Unna. En *na*, on voit les cellules neurogliques dont les noyaux sont en pycnose; le protoplasma de ces cellules montre, de plus, des granulations groupées sous forme de rayons partant du noyau. Ces figures correspondent à l'état préamiboïde de la cellule neuroglique. Les autres cellules neurogliques, qui se trouvent entre les cellules nerveuses, paraissent normales. En *c*, deux capillaires coupées transversalement.

2° Cellule nerveuse de la corne antérieure de la moelle épinière d'un cobaye sacrifié en pleine crise d'anaphylaxie hydatique (obs. 10). On y voit, en outre de la chromatolyse, un certain nombre de canaux sinueux limités à un coin du protoplasma.

3° Grande cellule pyramidale de la région motrice de l'écorce cérébrale (cellule de Betz) d'un cobaye sacrifié après avoir reçu 29 injections quotidiennes d'extrait de *Tænia plicata*. Elle est ratatinée, en tire-bouchon, en

chromatolyse ; de plus, son noyau est irrégulier, déformé et le karyoplasme a pris une teinte légèrement bleuâtre.

4° Cellule nerveuse de la corne antérieure de la moelle épinière d'un cobaye en agonie, sacrifié 5 heures après l'injection d'extrait de sclérostomes. Cette cellule est surtout intéressante par un nombre considérable de canaux creusés dans un coin du protoplasma ; en outre, elle présente un début de chromatolyse.

5° Cellule pyramidale de l'écorce cérébrale d'un cobaye sacrifié en pleine crise d'anaphylaxie hydatique (obs. 15). Etat réticulé du protoplasma, chromatolyse, canaux.

6° Deux cellules pyramidales de l'écorce cérébrale d'un cobaye mort après avoir reçu 20 injections de toxine ascaridienne.

nâ, cellules neurogliques avec noyaux pycnotiques ;

n, cellule neuroglique normale.

INFLUENCE
DE DIFFÉRENTES ESPÈCES DE SACCHAROMYCES
SUR MILIEUX ARTIFICIELS ET NATURELS

par Jules VENTRE.

AVANT-PROPOS

La question des levures et des ferments purs mise à l'ordre du jour par les travaux mémorables de Pasteur était restée stationnaire en ce qui concerne l'œnologie. Seules, les industries de la brasserie et les industries de fermentation y faisaient appel. Si l'industrie de la vinification n'avait pas profité des découvertes biologiques qui donnaient d'aussi bons résultats ailleurs, c'est que le milieu plus complexe qu'est le moût de raisin se prête moins bien au développement des ferments purs. Qu'on ait affaire à du moût d'orge ou à un milieu inerte comme la pâte, on n'a pas à craindre que des germes naturels viennent contre-balancer l'action des ferments sélectionnés qu'on y a introduits.

La notion de purification du milieu, avant tout ensemencement, était trop simple pour qu'on n'ait pas songé à appliquer à la vinification ce qui réussissait si bien partout ailleurs.

Depuis que Pasteur, introduisant dans un moût d'orge une levure tirée d'un vin de Champagne avait obtenu un produit à bouquet vinique, la plupart des œnologues avaient été hantés par l'idée de faire avec des moûts de qualité inférieure des vins de grands crus.

Rommier, Marx, Martinand et Rietsch. Jacquemin avaient essayé de trouver une formule pratique de l'emploi des levures à la vinification, mais n'avaient jamais obtenu de résultats constants. Il faut arriver aux travaux de Kayser pour trouver une étude systématique des principales levures indigènes ou sélectionnées pouvant être employées dans le Midi. Au profes-

seur Rosenstiehl revient l'honneur d'avoir pensé à appliquer au moût de raisin les procédés de stérilisation par la chaleur en usage en brasserie notamment. Cependant ces moyens, nécessitant des dépenses assez considérables, ne devaient pas prendre une grande extension et devaient, au contraire, rester l'apanage de quelques propriétaires.

Même, malgré la réalisation d'une stérilisation, les résultats obtenus avec les diverses variétés de ferments ne pouvaient être donnés comme constants. En effet, l'action de la chaleur n'est pas durable et difficilement applicable à une grande masse de vendange; pour peu que l'atmosphère ambiante soit contaminée, les produits stérilisés seront susceptibles de redevenir la proie de mauvais ferments.

Dans ces dernières années, l'emploi des levures paraît s'être généralisé avec la pratique du sulfitage. L'acide sulfureux, étant un puissant antiseptique, joue le rôle de stérilisateur et persiste dans le milieu à l'état actif pendant un temps suffisamment long pour permettre aux ferments introduits dans la vendange de se développer à l'exclusion des autres. Ce qu'il importe donc de connaître, c'est la manière dont se comportent les diverses sortes de levures placées dans le même milieu.

Le but du travail que j'ai entrepris est l'étude de l'influence de certains ferments ellipsoïdaux sur différents milieux de nature et de composition variables (moût de raisins rouges ou blancs, de richesse saccharine élevée ou faible, etc.). Sur les conseils de M. le professeur G. Bertrand, j'ai mis en œuvre les quatre principales levures le plus généralement utilisées dans la région méridionale.

De manière à me rendre compte de la fixation des espèces étudiées, je les ai fait agir comparativement sur des liquides fermentescibles naturels (moût de raisin chauffé, sulfité, enfin stérilisé par filtration à la bougie Chamberland) et artificiels (sucre, touraillons, maltopeptone, cendre de levure, phosphate d'ammoniaque) traités de la même manière que les précédents.

Afin de contrôler, dans ces essais préalables, la marche des fermentations et de connaître la façon dont chaque levure se comporte, j'ai suivi leur évolution en faisant le dosage de certains éléments qu'à juste titre on considère comme spécifiques de l'état biologique des ferments, notamment l'alcool et

l'acidité volatile. Le dosage de l'extrait qui, dans certains cas, peut donner de précieuses indications, n'a été effectué que subsidiairement ainsi que le dosage de l'acidité totale.

Ce sont ces levures, dont j'avais ainsi vérifié les caractères, qui m'ont servi à effectuer les essais dont j'ai montré précédemment le but.

Dans les produits de fermentation, j'ai dosé tous les éléments que des méthodes sûres me permettaient de rechercher : alcool, acidité fixe et volatile, extrait sec et ses constituants principaux (glycérine, acide succinique etc.). On retrouvera, au cours du travail, et au fur et à mesure des besoins, la description des méthodes d'analyses que j'ai adoptées. Afin de me rendre compte de l'influence des ferments sur l'acidité, j'ai également effectué certaines recherches sur la constitution de l'acidité fixe. C'est l'ensemble de ces résultats partiels qui m'a permis de dégager des conclusions montrant à quel point la levure pouvait influencer le milieu dans lequel elle se développe et lui donner un caractère spécial et variable avec l'espèce étudiée.

Avant de rentrer dans le détail de mes recherches, je dirai quelques mots sur l'historique de la question.

Historique critique de nos connaissances sur l'influence des ferments sur milieu fermentescible

Indépendamment des travaux de Pasteur qui, le premier, ayant ajouté des levures de champagne à du moût d'orge trouva dans le produit obtenu le bouquet vinique, nous devons signaler les recherches de Marx qui, en 1888, étudia les levures de vin non seulement au point de vue biologique et botanique, mais encore au point de vue chimique. Son étude porta surtout sur leur faculté de produire des substances volatiles, leur force de résistance contre certains acides et les hautes températures. Il insiste également sur les différences de goût que donnaient certaines variétés de ferments. Carl Amthor, un peu plus tard, a également étudié les levures de vin en se plaçant au point de vue de la sporulation et du temps employé à la fermentation. Dans la même période, Jacquemin, Martinand et Rietsch, Muller-Thurgau, Wortmann, Forti, Mach et Port

firent des essais analogues, soit au laboratoire, soit en grande pratique.

Cependant, entre tous, Wortmann établit d'une manière précise que les différences qui peuvent exister entre les diverses levures sont déjà perceptibles à l'analyse chimique des produits de la distillation. Chaque race de levure, dit-il, a d'ailleurs, plus ou moins, quelque chose de particulier dans l'action qu'elle exerce dans chaque moût, quelles qu'en soient la provenance ou la composition. L'étude de l'extrait sec lui donna des renseignements intéressants : c'est ainsi que, dans une expérience, la levure de Würtzbourg consomma beaucoup moins d'extrait que la levure de Johannisberg, laquelle, à son tour, se montra moins exigeante que celle d'Ahrweiler. Il remarqua surtout que la quantité de glycérine produite était toujours plus importante dans la levure de Würtzbourg.

Kayser, comparant différentes espèces de levures, constata que la quantité d'acidité volatile variait avec l'espèce. Cependant les expériences entreprises par cet auteur ne donnent pas toujours la précision voulue, car les quantités d'acides volatils trouvées sont très souvent judiciables d'un état pathologique spécial du milieu. En outre, dans la plupart des essais, il reste dans le produit fermenté des quantités appréciables de sucre résiduel qui entache d'erreurs la détermination de l'alcool et de l'extrait sec. Forti s'occupe seulement de rechercher les exigences de certaines levures eu égard aux matières azotées, et leur plus ou moins grande résistance aux hautes températures. Jörgensen remarque que les espèces peuvent garder, pendant leur conservation, les particularités qui les caractérisent. Ses expériences démontrent que des caractères même faiblement marqués tels que les caractères organoleptiques purent être retrouvés après plusieurs années de conservation et après une nouvelle culture pure.

Au point de vue goût, notamment, on peut citer les hypothèses si intéressantes de M. le professeur Rosenstiehl; celui-ci, en effet, admet que toutes les levures ne sont pas susceptibles de donner dans tous les milieux des produits similaires quant au goût. D'après lui, il existerait dans le moût une substance qu'il appelle *anthophore* : les levures, par contre, contiendraient une autre substance pouvant mettre en valeur

la première. Autrement dit, il faudra que la matière *anthogène* contenue dans la levure convienne à la matière renfermée en puissance dans le moût, pour qu'il y ait développement du bouquet caractéristique du cru dont la levure provient. Il se se passerait là un phénomène analogue à ce qui se passe dans la transformation de l'amygdaline en acide cyanhydrique, glucose, essence d'amande amère, sous l'action de l'émulsine.

Il semblerait que, pratiquement, cette hypothèse si élégante reçoit un commencement d'application. En effet, il m'a été donné de remarquer, au cours des dernières vendanges, que les mêmes levures donnaient des produits différents selon la nature des moûts de raisin dans lesquels elles se développaient. C'est ainsi que, dans un moût à base de Carignan, les ferments qui donnaient de bons résultats dans les moûts d'Aramon ne donnaient que des produits souvent inférieurs au témoin non traité; le contraire était vrai quand on cultivait sur moût d'Aramon des ferments donnant d'excellents résultats avec des moûts de Carignan.

Dans les expériences que j'ai entreprises, j'ai justement voulu me rendre compte de l'influence plus ou moins grande que pouvait avoir l'espèce de ferment adopté.

Choix des milieux.

Il était avant tout important de choisir des milieux de culture divers susceptibles de mettre en valeur les diverses caractéristiques des ferments à étudier.

J'ai pensé bien opérer en faisant porter mes expériences sur deux milieux artificiels, l'un neutre, l'autre acide, ainsi que sur un milieu naturel. Les milieux artificiels avaient la composition suivante :

Sucre (glucose)	170 gr. » par litre.
Extrait de Touraillon	2 gr. » par litre.
Peptone (maltopeptone)	0 gr. 5 par litre.
Cendre de levure	0 gr. 5 par litre.
Phosphate biammonique	1 gr. » par litre.

Dans le milieu acide, de composition générale identique au

précédent, l'acidité était de 5 gr. 3 par litre exprimé en acide sulfurique et était constituée de la manière suivante :

Acide tartrique	4 gr. » par litre.
Acide malique	5 gr. » par litre.
Acide citrique	0 gr. 5 par litre.
Carbonate de potasse.	1 gr. 85 par litre.

Le milieu naturel sur lequel j'ai opéré est du moût de raisin conservé depuis la récolte précédente par chauffage au bain-marie à 100 degrés en bouteilles hermétiquement closes.

Tous ces échantillons ont été divisés en trois parties égales; l'une a été chauffée à l'autoclave à 120 degrés, l'autre stérilisée par filtration à la bougie, enfin la troisième traitée à l'acide sulfureux. La quantité de liquide était telle que j'ai pu en faire trois lots destinés à être ensemencés à des époques déterminées à l'avance (janvier, avril, fin juin). Les échantillons non utilisés immédiatement étaient conservés dans un endroit frais et en bouteilles absolument pleines; il fallait éviter en effet, autant que possible, l'oxydation par l'air et surtout un contact trop prolongé de ces milieux éminemment fermentescibles avec l'air qui renferme toujours des quantités plus ou moins considérables de germes. Ces derniers trouvant un milieu propice, se développeraient avec vigueur et empêcheraient ainsi toute expérience de contrôle.

Choix des levures a expérimenter.

Comme je l'ai déjà dit précédemment, j'ai voulu opérer sur les levures les plus communément employées dans le midi de la France. Parmi celles-là, je me suis adressé, pour les vins rouges :

A de la levure de Beaujolais provenant du cru de *Moulin à vent*;

A de la levure de Bourgogne, provenant du cru de *Romanée-Conti*;

A de la levure de Médoc, provenant du cru de *Margaux*.

et pour les vins blancs :

A de la levure de Champagne Verzenay, provenant de la maison Chandon.

A propos de ces levures, je suis heureux de remercier l'administration de l'Institut zymotechnique de Montpellier, qui a

bien voulu mettre à ma disposition toutes les levures dont je pouvais avoir besoin, tant au point de vue de mes expériences à la propriété que de mes recherches de laboratoire.

Recherches sur la fixation des espèces de levures employées. — Il aurait été très imprudent de se livrer à l'étude des ferments sans s'être au préalable assuré que les caractères biologiques des diverses levures employées étaient parfaitement bien fixés. Dans ce but, j'ai entrepris une série de recherches et voici comment j'ai organisé mes expériences :

1° J'ai commencé par obtenir une culture pure de lie sur gélatine puis dans un moût de raisin stérilisé. Ceci fait, j'ai conservé les divers ferments dans une solution sucrée (saccharose) à 10 p. 100. Etant certain de la pureté de la cellule initiale, j'ai étudié l'action biologique des diverses levures de la manière suivante :

J'ai ensemencé chacune des espèces à étudier, dans le même milieu, neutre ou acide, dont il a été question précédemment. J'ai étudié d'abord le temps mis par chaque levure pour transformer complètement le sucre en alcool. Je dirai d'abord, et une fois pour toutes, que dans tous les essais j'ai eu des fermentations excessivement régulières et que leur durée a été sensiblement la même partout. L'étude chimique a été entreprise pour tous les échantillons.

Les lies ont été examinées au microscope de manière à contrôler leur pureté, puis conservées exactement de la même manière que les cellules initiales. Ce premier essai ayant eu lieu en janvier 1911, on en a fait un second en avril de la même année, mais en utilisant alors comme germes ceux qui provenaient des lies de la première fermentation. L'allure générale du phénomène a été la même que précédemment. Les produits obtenus ont été soumis à l'examen chimique et ont donné, ainsi qu'on pourra le constater dans les tableaux qui suivent, des résultats identiques;

2° De manière à être assuré définitivement de la constance des données biologiques, j'ai fait, en opérant comme précédemment, un troisième essai, c'est-à-dire que, le milieu restant le même, je me suis servi comme germes de ceux provenant de la précédente fermentation.

Voici les résultats obtenus :

TABLEAU I. — **Milieu neutre.**

	Beaujolais	Médoc	Romanée	Verzenay
Essai. Janvier 1911.	—	—	—	—
Alcool	9°85	9°6	9°9	9°85
	gr.	gr.	gr.	gr.
Acidité totale en acide sulfurique	1,985	2,254	1,960	1,981
Acidité volatile en acide sulfurique	0,184	0,252	0,172	0,198
Essai. Avril 1911.				
Alcool	9°8	9°6	9°85	9°8
	gr.	gr.	gr.	gr.
Acidité totale en acide sulfurique	1,954	2,24	1,962	1,972
Acidité volatile en acide sulfurique	0,190	0,28	0,182	0,202
Essai. Juin 1911.				
Alcool	9°8	9°55	9°9	9°85
	gr.	gr.	gr.	gr.
Acidité totale en acide sulfurique	1,960	2,25	1,970	1,972
Acidité volatile en acide sulfurique	0,187	0,278	0,180	0,198

TABLEAU II. — **Milieu artificiel acide.**

	Beaujolais	Médoc	Romanée	Verzenay
Essai. Janvier 1911.	—	—	—	—
Alcool p. 100	9°9	9°6	9°95	9°9
	gr.	gr.	gr.	gr.
Acidité totale en acide sulfurique	4,3	4,6	4,5	4,4
Acidité volatile en acide sulfurique	0,218	0,307	0,225	0,234
Crème de tartre	4,24	4,59	4,3	4,59
Acide tartrique total en tartre	4,5	4,5	4,42	4,56
Essai. Avril 1911.				
Alcool p. 100	9°8	9°6	9°9	9°85
	gr.	gr.	gr.	gr.
Acidité totale en acide sulfurique	4,2	4,75	4,5	4,5
Acidité volatile en acide sulfurique	0,21	0,32	0,237	0,237
Crème de tartre	4,24	4,5	4,37	4,51
Acide tartrique total en tartre	4,37	4,56	4,43	4,56
Essai. Juin 1911.				
Alcool p. 100	9°8	9°6	9°9	9°8
	gr.	gr.	gr.	gr.
Acidité totale en acide sulfurique	4,4	4,8	4,6	4,4
Acidité volatile en acide sulfurique	0,23	0,334	0,248	0,263
Crème de tartre	4,51	4,76	4,44	4,67
Acidité totale en tartre	4,6	4,78	4,47	4,67

TABLEAU III. — **Moût de raisin pasteurisé.**

	Beaujolais	Médoc	Romanée	Verzenay
Essai. Janvier 1911.	—	—	—	—
Alcool p. 100	8°6	8°3	8°55	8°65
	gr.	gr.	gr.	gr.
Acidité totale en acide sulfurique	5,3	5,3	5,1	5,1
Acidité volatile en acide sulfurique	0,242	0,38	0,210	0,291
Creme de tartre	3,92	3,83	4,10	4,04
Acide tartrique total en tartre	3,95	3,71	3,91	3,95
Extrait sec à 100 degrés	19,20	19,80	19,73	17,50

	Beaujolais	Médoc	Romanée	Verzenay
Essai. Avril 1911.	—	—	—	—
Alcool p. 100.	8°6	8°2	8°5	8°6
	gr.	gr.	gr.	gr.
Acidité totale en acide sulfurique	5,3	5,2	5,0	4,95
Acidité volatile en acide sulfurique	0,272	0,394	0,234	0,278
Extrait sec à 100 degrés	19,32	19,87	19,44	17,80
Crème de tartre	3,74	3,71	3,87	3,96
Acide tartrique total en tartre.	3,74	3,68	3,78	3,87
Essai. Juin 1911.				
Alcool p. 100.	8°5	8°3	8°5	8°55
	gr.	gr.	gr.	gr.
Acidité totale en acide sulfurique	5,3	5,3	5,1	5,15
Acidité volatile en acide sulfurique	0,264	0,396	0,218	0,298
Extrait sec à 100 degrés	19,12	19,84	19,20	17,60
Crème de tartre	3,87	3,83	4,04	3,91
Acide tartrique total en tartre.	3,91	3,70	3,87	3,87

Si nous examinons les chiffres représentatifs de l'acidité volatile pour les essais opérés en moût artificiel neutre ou acide, nous nous apercevons que chaque levure imprime au milieu un cachet chimique spécial. En effet, la quantité de produits volatils est à peu de chose près la même pour chaque levure et dans chaque milieu. Pour ce qui est de la teneur en extrait sec, on voit également dans le milieu naturel que chaque levure agit différemment.

Il ressort de ces essais que les variétés de ferments sur lesquels j'ai opéré peuvent être considérées comme parfaitement fixées. En effet, d'un essai à l'autre, on retrouve exactement les mêmes caractères; quant aux différences que l'on rencontre dans les dosages, elles sont de l'ordre des erreurs d'analyse.

On peut donc admettre que les levures de *Beaujolais*, *Médoc*, *Romanée*, *Verzenay*, sur lesquelles j'ai opéré, sont fixées.

De manière à me rendre compte si les caractères que j'avais observés étaient le fait d'espèces spéciales ou si elles étaient générales, j'ai recommencé mes expériences avec d'autres levures des mêmes crus, ou plutôt vendues comme Beaujolais, Médoc, Romanée et Verzenay, et provenant de l'Institut Pasteur de Paris. Les résultats analytiques que j'ai obtenus sont identiquement les mêmes, ou plus exactement du même ordre que les précédents. On peut donc admettre que chaque levure a une somme de caractères qui permettent de la différencier d'avec d'autres. Ces caractères chimiques pourraient, par conséquent, servir au classement des espèces, et peut-être plus sû-

rement que les méthodes basées sur les caractères botaniques ou morphologiques.

Les caractères de chaque levure étudiée étant parfaitement fixés, je me suis proposé de rechercher comment elles se comporteraient en présence de moût de raisin frais. Je pensais, en même temps, faire servir ces expériences à contrôler l'hypothèse de M. le professeur Rosentiehl, sur les qualités anthogènes des ferments. A cet effet j'ai ensemencé les quatre levures en question, simultanément dans du moût de raisin blanc et dans du moût de raisin rouge, c'est-à-dire dans des substances antophores différentes.

Choix des cépages à expérimenter. — J'ai fait porter mes essais sur deux variétés de cépages aussi différentes que possible tant au point de vue de la constitution chimique de leurs vins que de leurs qualités organoleptiques. Pour les essais rouges, j'ai employé l'Aramon; pour les essais en blanc, la Clairette, dont le vin présente des caractères spéciaux organoleptiques facilement reconnaissables. Dans ces conditions, les essais devenaient d'autant plus intéressants que le ferment employé pouvait être susceptible d'annihiler un cachet particulier et d'en imprimer un nouveau très différent. L'Aramon, sans personnalité propre, puisque complètement neutre, pouvait permettre de recueillir également d'excellentes observations.

Les expériences ont été poursuivies au cours de deux vendanges successives et ont toujours porté sur des raisins sains; il fallait, en effet, qu'aucun facteur étranger ne vienne apporter de perturbations dans les résultats, afin de pouvoir être certain que les caractères particuliers relevés dans les différents échantillons provenaient bien uniquement des conditions de fermentation réalisées.

Voici la manière dont on a préparé les échantillons.

Opérant pour chaque cépage sur environ 125 à 130 kilogrammes de vendange aussi saine que possible, je procédais, avant tout foulage, à un lavage grossier des raisins pour éliminer la plus grande partie des ferments indigènes qu'apporte avec elle la vendange. Ceci fait, on procédait à un foulage aussi parfait que le permettaient les instruments employés, et cela de manière à obtenir le maximum de moût; la quantité

de liquide recueilli variait, dans ces conditions, entre 90 et 100 litres. Sur ce volume, on prélevait d'abord environ 5 litres de moût qu'on stérilisait par la chaleur et qui devait servir ultérieurement à constater la richesse initiale du milieu. Cet échantillonnage une fois effectué, le restant du moût était divisé en trois lots égaux qui étaient traités de la même manière que les milieux artificiels dont il a été question précédemment, c'est-à-dire :

1° *Par filtration* ;

2° *Par chauffages* répétés trois fois à vingt-quatre heures d'intervalle et à 70 degrés environ (Tyndallisation);

3° *Par sulfitage* à raison de 250 milligrammes d'acide sulfureux par litre.

De toutes ces opérations, celle qui m'a donné le plus de peine à réaliser d'une manière parfaite est, sans contredit, la stérilisation par filtration à la bougie Chamberland; cela est si vrai que, lors de mes essais de 1911, il m'a été matériellement impossible d'empêcher la fermentation de se déclarer spontanément dans les lots blancs ou rouges. Cet échec dans la filtration est facilement explicable. En effet, si, dans le courant de l'année et au laboratoire, il est facile de se mettre à l'abri des contaminations possibles par les germes étrangers, il n'en est plus de même au moment des vendanges, car la quantité de levures et de bactéries qui se trouve dans l'air est considérable et il est très difficile de s'en préserver. Cependant, si on s'en tient à une stérilisation relative, et j'entends par stérilisation relative celle qui permet de conserver les échantillons ainsi traités, au moins quarante-huit heures, muets, on arrive assez facilement à de bons résultats. C'est pour avoir voulu, en 1911, demander l'impossible, que je n'ai pu conserver l'essai filtré. Aussi, dans le compte rendu des analyses, ne trouvera-t-on rien de relatif à cet essai. Il est bien évident que les essais filtrés de 1912 et ensemencés ensuite avec les levures à expérimenter peuvent être considérés comme normaux, puisque la fermentation s'y est déclarée six à huit heures après l'ensemencement, tandis que l'échantillon conservé comme témoin n'a fermenté que cinq jours après.

Préparation des échantillons filtrés. — Le moût de raisin, de consistance relativement épaisse, passerait très difficilement à

la bougie de Chamberland, si on ne prenait la précaution de le dégrossir, c'est-à-dire de le séparer de tous les débris de peau, de pulpe, par une filtration grossière à travers une manche en tissu molletonneux du modèle ordinaire employé dans les celliers. Pour parfaire le travail et le rendre plus facile, je me suis adressé, après comparaison avec les résultats obtenus avec la bougie, à la filtration sur amiante ou sur papier, en me servant du filtre petit modèle « *Simplex* » adopté dans certaines villes pour la filtration des eaux. J'ai eu de cette façon des échantillons que j'ai pu conserver pendant tout le temps nécessaire à l'opération.

Avant de passer à l'examen des résultats analytiques, je dirai quelques mots sur l'allure générale des fermentations dans chacun des essais.

Allure et rapidité de la fermentation. — La connaissance de ce facteur est très importante car on sait que c'est sur lui que certains expérimentateurs s'appuient, et avec assez de raison, pour expliquer les plus ou les moins grandes quantités de produits secondaires (glycérine, acide succinique) que l'on rencontre dans les fermentations. D'une façon générale, toutes les fermentations ont été également rapides et se sont terminées dans un laps de temps variant entre cinq et six jours. La température s'est maintenue dans tous les essais entre 24-26 degrés centigrades, et cela d'autant mieux qu'ils étaient placés dans une salle où la température n'est jamais montée au-dessus de 23 degrés.

Facies général des liquides en fermentation. — A part les essais ensemencés avec la levure de Médoc qui sont restés, pendant un temps relativement long, troubles et difficiles à clarifier, les autres n'ont guère perdu de leur limpidité, même au cours de fermentation. Craignant que, au moins pour les essais Médoc filtrés, ce trouble ne soit dû au développement de bactéries, j'en ai fait régulièrement l'examen microscopique, et je n'ai jamais observé, dans les dépôts, la moindre bactérie de tourne, d'amer ou de ferment visqueux.

Le dépôt formé par les levures présente également des caractères différentiels, selon la levure employée. C'est ainsi que le Verzenay donne des masses restant en suspension et affectant une forme floconneuse; les autres, et plus particuliè-

rement celle de Romanée a, au contraire, l'aspect lourd. Ces caractères paraissent être bien fixés et n'appartenir qu'à une espèce déterminée.

Composition des milieux naturels dans lesquels les levures ont été expérimentées. — J'ai effectué les divers dosages qui devaient me servir de base d'appréciation dans les analyses des produits obtenus après fermentation. Voici les données analytiques auxquelles je suis arrivé :

	SUCRE p. 100.	ACIDITÉ TOTALE en acide sulfurique par litre.	ACIDE sulfureux par litre.
Moût de Clairette, 1911.	—	—	—
	gr.	gr.	gr.
Moût chauffé	16,95	4,9	»
Moût sulfité	16,95	5,15	0,173
Moût d'Aramon, 1911.			
Moût chauffé	18,00	5,6	»
Moût sulfité.	17,90	5,8	0,170
Moût de Clairette, 1912.			
Moût filtré	21,00	5,53	»
Moût chauffé	21,00	5,53	»
Moût sulfité	21,00	5,75	0,186
Moût d'Aramon, 1912.			
Moût filtré	16,65	8,86	»
Moût chauffé	16,65	8,9	»
Moût sulfité.	16,65	9,07	0,172

Chaque échantillon de moût a été prélevé en triple exemplaire de manière à pouvoir, le cas échéant, faire des analyses de contrôle.

RÉSULTATS ANALYTIQUES OBTENUS SUR LES VINS

Année 1911.

	Beaujolais	Médoc	Romanée	Verzenay
VINS BLANCS CHAUFFÉS	—	—	—	—
Alcool en volume dist. p. 100	9°85	9°5	9°85	9°8
	gr.	gr.	gr.	gr.
Acidité totale en acide sulfurique p. 1.000.	3,95	4,5	4,1	4,15
Acidité volatile en acide sulfurique	0,24	0,35	0,252	0,32
Acidité fixe en acide sulfurique	3,71	4,15	3,848	3,83
Extrait à 100 degrés	13,875	14,95	13,55	12,90
Cendres totales	2,24	2,48	2,36	2,16
Alcalinité en crème de tartre.	4,88	4,92	5,00	4,83
Crème de tartre	4,70	4,75	4,82	4,74
Acide tartrique total en crème.	6,35	6,177	6,177	6,39

	Beaujolais	Medoc	Romanée	Verzenay
VINS BLANCS SULFITÉS	—	—	—	—
Alcool en volume dist. p. 100	9°8	9°5	9°8	9°8
	gr.	gr.	gr.	gr.
Acidité totale en acide sulfurique p. 1.000	4,75	5,1	5,00	5,1
Acidité volatile en acide sulfurique	0,309	0,499	0,252	0,268
Acidité fixe en acide sulfurique	4,991	4,251	4,748	4,832
Extrait sec à 100 degrés	16,20	16,10	16,05	15,95
Cendres totales	2,20	2,27	2,21	2,06
Alcalinité en crème de tartre	4,818	4,837	5,00	4,818
Crème de tartre	4,77	4,78	4,86	4,72
Acide tartrique total en crème	5,74	5,81	5,84	5,70

Nous voyons d'ores et déjà que l'acide sulfureux a une action bien marquée sur la manière dont se comportent diverses levures vis-à-vis des milieux naturels. On se rend compte, en effet, que la quantité d'extrait qui, dans les milieux chauffés, varie avec chaque ferment, est sensiblement la même dans les milieux sulfités. Dans les essais rouges, on retrouvera les mêmes caractères.

	Beaujolais	Médoc	Romanée	Verzenay
VINS ROUGES CHAUFFÉS	—	—	—	—
Alcool en volume dist. p. 100	10°8	10°6	10°85	10°8
	gr.	gr.	gr.	gr.
Acidité totale en acide sulfurique p. 1.000.	4,77	5,00	5,1	4,63
Acidité volatile en acide sulfurique	0,307	0,505	0,322	0,405
Acidité fixe en acide sulfurique	4,463	4,495	4,778	4,225
Extrait sec à 100 degrés (1)	14,32	15,20	14,85	13,70
Cendres totales	2,06	2,08	2,09	1,98
Alcalinité des cendres en tartre	5,04	4,96	5,12	4,96
Crème de tartre	4,85	4,84	4,96	4,80
Acide tartrique total en tartre	6,09	6,17	6,22	5,78
VINS ROUGES SULFITÉS				
Alcool en volume dist. p. 100	10°8	10°6	10°8	10°8
	gr.	gr.	gr.	gr.
Acidité totale en acide sulfurique p. 1.000	5,6	5,72	5,50	5,65
Acidité volatile en acide sulfurique	0,375	0,449	0,331	0,357
Acidité fixe en acide sulfurique	5,225	5,271	5,169	5,293
Extrait sec à 100 degrés	17,30	17,50	17,65	17,40
Cendres totales	2,260	2,320	2,370	2,260
Alcalinité des cendres en tartre	5,086	5,128	5,044	5,044
Crème de tartre	4,92	4,96	4,92	4,90
Acide tartrique total en tartre	5,91	5,88	5,88	5,95

De ces premières analyses, il ressort clairement que l'acide sulfureux a une action absolument nette sur la biochimie des

(1) Je rappelle que les essais rouges ont porté uniquement sur des moûts et non sur la vendange entière : ceci pour répondre aux objections qu'on ne ne manquerait pas de me faire, en considérant la faiblesse de ces vins en matière extractive.

ferments. Cette constatation jette donc un jour nouveau sur l'influence de ce puissant agent antiseptique. Cela explique, en effet, comment des vins, paraissant relativement pauvres en extrait sec, voient cet élément augmenter dans de notables proportions et deviennent normaux. On verra dans les recherches biochimiques auxquelles je me suis livré, à quoi est dû l'appauvrissement ou l'enrichissement des produits en matières extractives.

Essais 1912.

	Témoin	Beaujolais	Médoc	Romanée	Verzenay
VINS BLANCS FILTRÉS	—	—	—	—	—
Alcool en volume dist. p. 100. .	12°15	12°35	11°85	12°15	12°35
	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.
Acidité tot. en ac. sulfur. p. 1.000.	4.65	4.65	4,90	4,85	4,57
Ac. volatile en ac. sulfurique. .	0.433	0,427	0,615	0,415	0,417
Acidité fixe en ac. sulfurique. .	4.217	4,223	4,285	4,435	4,153
Extrait sec à 100 degrés	16.85	15,60	16,85	16,70	15.30
Extrait sec dans le vide	17,40	16,95	18,45	17.70	16,40
Cendres totales	1,64	1.70	1,81	1,92	1,78
Alcalinité des cendres en tartre .	3,51	3.18	3,14	3,55	3,42
Crème de tartre	3.14	2.84	2,80	3,14	3,06
Acide tartrique total en tartre .	4,04	3.70	3.70	4.04	3,95
VINS BLANCS CHAUFFÉS					
Alcool en volume dist. p. 100. .	12°1	12°3	11°9	12°25	12°25
	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.
Acidité tot. en ac. sulfur. p. 1.000.	4,2	4,75	5:3	5,00	5,1
Ac. volatile en ac. sulfurique . .	0.367	0,301	0,438	0,334	0,326
Acidité fixe en ac. sulfurique . .	3,833	4,449	4.862	4,666	4,774
Extrait sec à 100 degrés.	16,10	16,62	18,80	18,20	14,30
Extrait sec dans le vide	18.00	17,85	19.95	18,35	17,60
Cendres totales.	1,98	2,16	2,22	2,23	2,19
Alcalinité des cendres en tartre.	3,50	4,045	4.17	4,045	3,96
Crème de tartre.	3.27	3,743	4,043	3,87	3,91
Ac. tartrique total en tartre. . .	4,043	4.51	4.75	4,59	4,76
VINS BLANCS SULFITÉS					
Alcool en volume dist. p. 100 . .	12°00	12°00	11°55	12°05	12°10
	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.
Acidité tot. en ac. sulfur. p. 1.000.	5,15	5.05	5.25	5,05	5,10
Acidité volatile en ac. sulfurique.	0,528	0,469	0.589	0.456	0,467
Acidité fixe en acidité sulfurique.	4,622	4,581	4,661	4,594	4,633
Extrait sec à 100 degrés.	16,73	16,20	16,10	16,10	15,95
Extrait sec dans le vide	17,90	17,85	19,25	18,05	17,75
Cendres totales.	1,74	1,98	2,00	2,02	2,14
Alcalinité des cendres en tartre.	3,51	3,345	3,345	3,26	3,47
Crème de tartre	3,47	3,29	3,11	3,20	3,29
Acide tartrique total en tartre. .	4.09	3,87	3,78	3.78	3,87

	Témoin	Beaujolais	Médoc	Romanée	Verzenay
VINS ROUGES FILTRÉS	—	—	—	—	—
Alcool en volume dist. p. 100 . .	9°7	9°9	9°6	9°95	9°8
	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.
Acidité tot. en ac. sulfur. p. 1.000.	7,95	7,05	7,45	7,9	7,75
Acidité volatile en ac. sulfurique.	0,283	0,248	0,349	0,329	0,308
Acidité fixe en acide sulfurique.	7,667	6,803	7,101	7,571	7,442
Extrait sec à 100 degrés.	20,42	20,2	20,45	20,45	19,5
Extrait sec dans le vide	21,50	21,20	22,35	21,20	20,60
Cendres totales	2,00	2,00	1,86	1,96	1,92
Alcalinité des cendres en tartre.	4,543	4,50	4,253	4,543	4,253
Crème de tartre	4,07	3,94	3,71	4,07	3,71
Acide tartrique total en tartre. .	5,89	5,57	5,18	5,48	4,99
VINS ROUGES SULFITÉS					
Alcool, en volume dist. p. 100. .	9°7	9°85	9°55	9°7	9°8
	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.
Acidité tot. en ac. sulfur. p. 1.000.	8,00	8,00	8,15	7,85	8,00
Acidité volatile en ac. sulfurique.	0,291	0,349	0,384	0,357	0,315
Acidité fixe en ac. sulfurique . .	7,209	7,651	7,766	7,493	7,685
Extrait sec à 100 degrés	20,67	20,30	20,50	20,15	20,17
Extrait sec dans le vide	22,10	21,60	22,45	21,50	21,50
Cendres totales	2,22	2,21	2,26	2,26	2,21
Alcalinité des cendres en tartre.	3,97	4,012	3,97	4,094	3,97
Crème de tartre.	3,27	3,31	3,27	3,17	3,22
Acide tartrique total en tartre. .	4,60	4,56	4,42	4,47	4,42
VINS ROUGES CHAUFFÉS					
Alcool en volume dist. p. 100. .	9°7	9°8	9°5	9°65	9°7
	gr.	gr	gr.	gr.	gr.
Acidité tot. en ac. sulfur. p. 1.000.	7,8	7,3	7,9	7,7	7,6
Acidité volatile en ac. sulfurique.	0,320	0,299	0,387	0,347	0,360
Acidité fixe en ac. sulfurique . .	7,480	7,301	7,513	7,363	7,240
Extrait sec à 100 degrés	20,47	16,95	19,85	15,55	15,90
Extrait sec dans le vide.	21,70	20,55	22,30	21,15	20,55
Cendres totales.	2,12	1,06	2,04	2,04	2,05
Alcalinité des cendres en tartre.	4,75	4,42	4,06	4,42	4,06
Crème de tartre.	3,93	3,62	3,40	3,58	3,40
Acide tartrique total en tartre .	5,67	5,10	4,65	4,73	4,69

De manière à me rendre compte si les effets produits par les ferments étaient temporaires ou véritablement acquis, j'ai recommencé, en janvier 1913, les analyses des essais effectués en 1911, c'est-à-dire pour des vins ayant quinze mois de conservation. J'ai, ainsi qu'on pourra s'en convaincre par l'examen du tableau suivant, retrouvé exactement les mêmes caractères et surtout des chiffres correspondant aux premiers, déduction faite des matières précipitées (crème de tartre, matière colorante, etc.).

Analyses effectuées en janvier 1913.

	Beaujolais	Médoc	Romanée	Verzenay
VINS BLANCS CHAUFFÉS	—	—	—	—
Alcool en volume dist. p. 100	9°8	9°6	9°85	9°85
	gr.	gr.	gr.	gr.
Acidité totale en acide sulfurique p. 1.000	3,81	4,306	3,76	3,96
Acidité volatile en acide sulfurique	0,313	0,583	0,364	0,434
Acidité fixe en acide sulfurique	3,497	3,723	3,396	3,526
Extrait sec à 100 degrés	12,55	13,85	12,025	11,40
Cendres totales	1,88	1,90	1,68	1,54
Alcalinité des cendres en tartre	3,78	3,78	3,36	3,25
Crème de tartre	3,71	3,71	3,15	2,90
Acidité tartrique total en tartre	5,70	5,90	5,23	4,76
VINS BLANCS SULFITÉS				
Alcool en volume dist. p. 100	9°75	9°55	9°75	9°8
	gr.	gr.	gr.	gr.
Acidité totale en acide sulfurique p. 1.000	4,059	4,257	4,65	4,70
Acidité volatile en acide sulfurique	0,319	0,370	0,309	0,312
Acidité fixe en acide sulfurique	3,740	3,887	4,341	0,388
Extrait sec à 100 degrés	14,55	14,50	14,55	14,325
Cendres totales	1,63	1,65	1,70	1,72
Alcalinité des cendres en tartre	3,035	3,035	2,898	2,774
Crème de tartre	2,85	2,95	2,775	2,57
Acide tartrique total en tartre	4,38	4,20	4,665	4,09

	Beaujolais	Médoc	Romanée	Verzenay
VINS ROUGES CHAUFFÉS	—	—	—	—
Alcool en volume dist. p. 100	10°9	10°7	10°05	10°85
	gr.	gr.	gr.	gr.
Acidité totale en acide sulfurique p. 1.000	3,96	4,207	4,059	4,059
Acidité volatile en acide sulfurique	0,434	0,583	0,447	0,429
Acidité fixe totale en acide sulfurique	3,526	3,624	3,612	3,630
Extrait sec à 100 degrés	12,40	13,16	12,67	11,65
Cendres totales	1,62	1,75	1,60	1,66
Alcalinité des cendres en tartre	3,24	3,12	3,18	3,43
Crème de tartre	3,15	3,05	3,12	3,27
Acide tartrique total en tartre	5,23	4,95	4,85	4,60
VINS ROUGES SULFITÉS				
Alcool en volume dist. p. 100	10°75	10°65	10°80	10,70
	gr.	gr.	gr.	gr.
Acidité totale en acide sulfurique p. 1.000	4,90	9,5	4,86	4,80
Acidité volatile en acide sulfurique	0,378	0,398	0,378	0,382
Acidité fixe en acide sulfurique	4,522	4,552	4,422	4,418
Extrait sec à 100 degrés	15,60	15,42	15,37	15,7
Cendres totales	1,80	1,66	1,80	1,82
Alcalinité des cendres en tartre	3,35	3,12	3,24	3,39
Crème de tartre	3,27	3,12	3,19	3,23
Acide tartrique total en tartre,	4,85	4,64	4,60	4,76

EXAMEN ORGANOLEPTIQUE DES DIVERS ÉCHANTILLONS.

Afin de voir l'effet produit par les levures dans chacun des milieux étudiés, j'ai soumis les produits entièrement fermentés à l'appréciation de dégustateurs consciencieux et très éclairés. De manière à éviter tout phénomène de suggestion, les échantillons ont été présentés à la dégustation sans autre indication extérieure qu'un numéro d'ordre. Voici le classement auquel se sont arrêtés les différents dégustateurs opérant séparément.

VINS 1911.

Ces vins ont été dégustés en janvier 1912 et en janvier 1913 ; comme on peut s'en rendre compte, les caractères organoleptiques, loin de perdre en intensité, paraissent, au contraire, s'exagérer.

Pour tous les échantillons, les numéros d'ordre étaient les suivants : 1° levuré Beaujolais, 2° levuré Médoc, 3° levuré Romanée-Conti, 4° levuré Verzenay.

Classement des vins chauffés (blancs).

1° *Verzenay.* — Très bon, infiniment supérieur aux autres ; présente une fraîcheur et une acidité qui se maintiennent même après un an de conservation. Cette acidité n'est point mordante et n'impressionne le palais qu'agréablement.

2° *Médoc.* — Le produit levuré médoc est inférieur au précédent, mais cependant supérieur aux deux derniers. Il est également d'une verdeur assez agréable qui se rapproche de celle du Verzenay.

3° *Romanée.* — De beaucoup inférieur au premier, mais cependant très bien conservé. Au point de vue gustatif, présente peut-être un peu plus de mâche que les autres ; il serait également moins acide et, par conséquent, moins frais au palais.

4° *Beaujolais.* — Le moins bon de la série ; il est très plat et présente des caractères de neutralité qui permettraient de le confondre avec des vins non traités. Ce manque de verdeur est si marqué qu'à la dégustation on ne le croirait pas de la même origine que les précédents.

Dans la *série des vins provenant de moûts sulfités*, on retrouve les mêmes caractères que dans les vins chauffés, mais cependant avec moins d'intensité.

Classement des vins rouges (1911).

Ici, on pourra tirer de la dégustation des renseignements intéressants. Les numéros d'ordre sont les mêmes que pour les précédents échantillons. Voici l'ordre dans lequel ils ont été classés :

1° *Beaujolais.* — Le meilleur, fin, fruité, donnant à la dégustation l'impression de ne pas appartenir à la catégorie des vins d'Aramon. La fraîcheur qui caractérise les échantillons levurés beaujolais, ne se retrouve dans aucun autre produit;

2° *Romanée-Conti.* — Cet échantillon est très bon, peut-être moins acide que le précédent, mais en même temps moins parfumé ;

3° *Médoc.* — Le produit levuré médoc est inférieur aux précédents; la levure paraît donner au produit un caractère de vieillesse qu'on retrouvera d'ailleurs dans tous les échantillons rouges levurés médoc;

4° *Verzenay.* — Produit infiniment moins bon que tous les précédents ; cependant, on ne peut pas relever contre lui de défaut capital. Il est très bien conservé et ne présente absolument pas de vices pouvant le faire rejeter comme trop mauvais. Il n'a, en tout cas, aucune des qualités qui avaient placé cette levure en tête du classement des vins blancs.

Vins 1912.

Les vins de l'année 1912, tout au moins les vins rouges, sont très acides. Il y a, comme on l'a vu, trois essais au lieu de deux. Tout d'abord, les dégustateurs admettent que les vins filtrés, quoique très bons, sont inférieurs comme qualité aux essais chauffés.

Le classement est absolument le même que pour les vins de 1911. En général, pour *les vins blancs*, les levures de *Verzenay* et de *Médoc* donnent les meilleurs résultats ; pour *les rouges*, par contre, les levures *Beaujolais* et *Romanée* triomphent. On doit retenir également que les deux premières donnent des produits infiniment plus acides au palais que ceux donnés par les secondes, et, cependant, cette impression d'acidité n'est pas en rapport avec les chiffres que l'on obtient quand on procède à la détermination quantitative de cet élément. (*A suivre.*)

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

28e ANNÉE MARS 1914 N° 3

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDES SUR LES STAPHYLOCOQUES DORÉS

I. — PARALLÈLE ENTRE DIVERS STAPHYLOCOQUES DORÉS D'ORIGINE HUMAINE ET ANIMALE

par M. J. DUMAS

Parmi les germes que nous avons étudiés, se trouvent six échantillons isolés de cas de botryomycose, des « botryocoques » par conséquent. On se convaincra, à la lecture de ce travail et du suivant, que de tels échantillons ne diffèrent *en rien* des staphylocoques dorés et ne méritent pas de conserver, dorénavant, un nom spécial.

Origine des germes étudiés.

Échantillons humains.

1. Abcès superficiel du doigt (tourniole).
2. Panaris profond.
3. Plaie suppurée du médius.
4. Abcès de la cuisse.
5. Abcès de la paroi abdominale (dû à l'obligeance de M. Masson; origine Gosset).
6. Abcès du sein, *post partum*.
7. Abcès du sein, chez une nourrice atteinte de scarlatine.
8. Sang d'un individu mort de furonculose, au décours d'une fièvre typhoïde (observation Mosny et Dumont — dû à l'obligeance de M. Dumont).

9. Ostéomyélite (staphylocoque isolé par M. Veillon, en 1896, et conservé dans la collection de l'Institut Pasteur).

9 *bis*. Même échantillon, conservé, depuis 1896, par M. M. Nicolle (identique, à tous égards, au précédent).

Échantillons animaux.

10. Mammite de la chèvre (dû à l'obligeance de M. Bridré).

11. Mammite de la brebis (dû à l'obligeance de M. Bridré).

12, 13, 14, 15. Champignons de castration du cheval (origine Césari).

16. Botryomycose pulmonaire du cheval (origine Césari).

17. Botryomycose généralisée du cheval (dû à l'obligeance de M. Borrel ; origine Césari).

Avec chacun de ces échantillons, il a été fait des *séparations* et on a prélevé, dans tous les cas, *trois colonies*, dont les caractères ont été étudiés parallèlement. Pour ne pas prolonger nos recherches au delà des limites indispensables, nous avons comparé entre eux nos 17 staphylocoques (soit $17 \times 3 = 51$ origines), en choisissant les critériums suivants : *forme* (dans les produits pathologiques et en culture), *caractères des cultures*, *fonction gélatinolytique*, *fonction saccharolytique*, *production d'hémolysine*, *virulence pour la souris*.

Forme.

Dans les produits pathologiques.

Sauf pour ce qui concerne les cas de botryomycose, il s'agissait toujours de *cocci*, régulièrement arrondis, disposés en amas, en diplos ou en chaînettes très courtes (3-4 éléments au maximum). Les grains botryomycotiques offraient, histologiquement, l'aspect bien connu (voir, à ce sujet, les travaux de M. Magrou).

Dans les cultures.

Milieu T (*vide infra*). Amas de 8-10 éléments en « grappe de raisin » ou chaînettes très courtes. Exceptionnellement, amas

de 3-4 *cocci* (n° 4) ou de 15-20 (n° 15). — Gélose au milieu T. Amas ou diplos.

Dans les cultures, on n'observe *aucune différence* entre les staphylocoques isolés de lésions botryomycotiques et ceux d'autres provenances.

Dans les produits et les cultures, les *cocci* prennent toujours très bien le Gram.

Caractères des cultures.

Milieu T.

Employé par MM. Truche et Cotoni, dans leurs recherches sur le pneumocoque et ainsi formulé : peptone Chapoteaut 4 p. 100, sel marin 0,5 p. 100, glucose 0,2 p. 100 (alcaliniser légèrement).

Après 24 heures à 37 degrés, on observe, *dans tous les cas*, un trouble uniforme du liquide, avec présence d'un dépôt glaireux, filant, à odeur de colle. Après 2-3 jours, ce dépôt se montre plus abondant et l'on observe, d'autre part, à la surface du milieu, une collerette d'épaisseur et de teinte variables, parfois même un voile pelliculaire et discontinu. Mêmes différences de pigmentation que pour la gélose T.

Gélose T.

Après 24 heures d'étuve, on aperçoit des colonies arrondies, surélevées, à bords nets, opaques, grasses, d'un blanc-grisâtre, qui se teintent peu à peu quand on met le tube à la température ordinaire. Au point de vue de l'intensité de la pigmentation, nos échantillons se classent en trois catégories.

(1) Staphylocoques produisant une couleur jaune-doré très vive : n°s 2, 6, 7, 9, 9 *bis*, 12, 14, 15.

(2) Staphylocoques produisant une couleur moins intense et terne : n°s 1, 3, 5, 6, 8, 11, 16, 17.

(3) Staphylocoques à teinte encore plus faible et plus terne : n°s 4, 13.

Lait.

Tous les échantillons le *coagulent* en 24 heures, à 37 degrés, avec acidification.

Fonction gélatinolytique.

Nous avons employé la gélatine, à 10 p. 100, au milieu T. Les cultures ont été faites par piqûre et laissées à la température ordinaire.

On voit d'abord apparaître, le long de la strie d'ensemencement, un trait plus ou moins coloré, qui s'accroît lentement. Après 3-4 jours, commence la liquéfaction, laquelle aboutit à la fonte de tout le tube ou demeure incomplète, selon les cas. Lors de liquéfaction incomplète, nous n'avons jamais vu se fluidifier plus du tiers environ du milieu ensemencé.

Au bout de 8 jours, ont liquéfié tout le tube : les nos 1, 3, 4, 5, 8, 10, 11, 14, 16 ; n'en ont liquéfié que le tiers : les nos 2, 6, 9, 9 *bis*, 12, 13, 15, 17.

En somme, *pouvoir gélatinolytique constant*, mais d'intensité variable, chez tous les staphylocoques étudiés. Notons en passant qu'on a eu tort de dire que les staphylocoques isolés des lésions botryomycotiques se caractérisaient par une faible liquéfaction de la gélatine.

Fonction saccharolytique.

Milieu employé : peptone 2 p. 100, sel marin 0,5 p. 100, sucre 0,5 p. 100.

Tous les échantillons fermentent : la *mannite*, le *glucose*, le *saccharose* et le *maltose* — tous fermentent, également, le *lactose* (comme l'indique, d'ailleurs, la coagulation du lait avec acidification — *vide supra*) ; les nos 1 et 14, cependant, moins que les autres — *deux*, seulement, *attaquent* la *glycérine* et encore avec peu d'énergie, les nos 2 et 5.

Production d'hémolysine.

A 1 cent. cube d'une culture en milieu T, demeurée 5 jours à l'étuve, on ajoutait 1 cent. cube d'une émulsion globulaire (hématies de lapin, bien lavées avec l'eau physiologique et émulsionnées, à 5 p. 100, dans ce même véhicule). Puis, on portait à 37 degrés, pour 1, 2, 3..., et jusqu'à 24 heures.

Certains échantillons n'ont jamais hémolysé, d'autres laquaient les globules *plus ou moins rapidement*, comme le montre le résumé suivant :

Hémolyse complète en quelques minutes : n° 16.
Hémolyse complète en 1 heure : n° 15.
Hémolyse complète en 2 heures : n°s 3, 4, 7.
Hémolyse complète en 5 heures : n°s 6, 11, 13.
Hémolyse complète en plus de 5 heures : n°s 1, 2, 8, 10.
Hémolyse nulle après 24 heures : n°s 7, 9, 9 *bis*, 14.

Plusieurs auteurs disent que le pouvoir hémolytique s'atténue avec les années, au point même de disparaître entièrement. Il a pu en être ainsi pour les échantillons 9 et 9 *bis*, mais non pour les staphylocoques 7 et 14.

Virulence pour la souris.

On injectait, sous la peau d'animaux de 20 grammes, des cultures en milieu T (24 heures d'étuve) aux doses décroissantes de : 1 cent. cube, 10^{-1} cent. cube (= 1/10), 10^{-2} (= 1/100), 10^{-3}, 10^{-4}.

Tantôt les sujets mouraient dans un temps variable (12 heures à quelques jours), tantôt ils offraient simplement une lésion suppurative locale, avec vaste escharification des téguments. Dans les cas mortels, on n'observait, à l'autopsie, que de la congestion pulmonaire (sans doute agonique); l'examen microscopique du sang ne montrait jamais de *cocci*, il fallait la culture pour les révéler.

Classant nos staphylocoques par virulence décroissante, nous pouvons caractériser brièvement leur activité comme il suit :

N° 11. — Une colonie tue à 10^{-4} cent. cube, la 2e à 10^{-3}, la 3e à 10^{-2}.
N° 13. — 2 colonies tuent à 10^{-3}, la 3e à 10^{-2}.
N°s 6 et 10. — 2 colonies tuent à 10^{-2}, la 3e à 10^{-1}.
N° 16. — 2 colonies tuent à 10^{-2}, la 3e à 1 cent. cube.
N°s 7, 8 et 15. — Une colonie tue à 10^{-2}, les 2 autres à 10^{-1}.
N°s 1 et 5. — 2 colonies tuent à 10^{-1}, la 3e à 1 cent. cube.
N° 17. — 2 colonies tuent à 10^{-1}, la 3e donne un abcès.
N°s 4 et 14. — Une colonie tue à 10^{-1}, les 2 autres à 1 cent. cube.
N°s 9, 9 *bis* et 12. — Les 3 colonies tuent à 1 cent. cube.
N° 2. — Une colonie tue à 1 cent. cube, les 2 autres donnent un abcès.
N° 3. — Abcès, à 1 cent. cube, avec les 3 colonies.

Jusqu'ici, nous n'avions noté aucune différence appréciable entre les trois colonies d'un même staphylocoque. En ce qui concerne la virulence, il ne faudrait pas s'exagérer l'importance des écarts observés. Ceux-ci, à tout prendre, ne sont pas considérables; d'autre part, *in vivo*, nous rencontrons un facteur variable, la résistance des animaux. Si nous avions inoculé, chaque fois, cent souris, les résultats moyens, obtenus avec les trois colonies d'un même germe, auraient peut-être été moins divergents.

L'étude de la virulence nous permet d'affirmer, contrairement à l'opinion de certains auteurs, que *la souris est parfaitement* (voire remarquablement) *sensible au staphylocoque*, dont elle constitue le réactif vivant le meilleur et le moins coûteux. Elle nous montre aussi que les échantillons, isolés des mammites humaines ou animales, semblent se distinguer par une grande activité; il en va de même pour certains staphylocoques de botryomycose.

Conclusions.

Les staphylocoques dorés constituent une « bonne espèce ». Les caractères communs font rarement défaut (production d'hémolysine) et des caractères particuliers apparaissent rarement (fermentation de la glycérine). Les variations demeurent presque toujours quantitatives et leurs limites peu étendues. Il ne paraît pas y avoir parallélisme entre le développement plus ou moins grand de tel caractère et celui de tel autre. *Les staphylocoques de botryomycose ne diffèrent nullement des autres*; des preuves irréfutables de cette identité seront d'ailleurs données dans le travail suivant, de M. Nicolle et Césari.

ÉTUDES SUR LES STAPHYLOCOQUES DORÉS

II. — TOXICITÉ DES ÉCHANTILLONS ÉTUDIÉS DANS LE TRAVAIL PRÉCÉDENT. VUE D'ENSEMBLE SUR LES STAPHYLOCOQUES DORÉS

par M. NICOLLE et E. CÉSARI

En 1896-1897, l'un de nous a fait de nombreuses expériences sur la toxine des staphylocoques dorés, avec le Dr Réfik-bey. L'échantillon, principalement étudié, nous avait été obligeamment fourni par le Dr Veillon (échantillon 9 *bis* du travail précédent) ; il tuait les lapins d'un kilogramme, dans la plèvre, sous le volume de 10^{-2} cent. cube (culture de 24 heures ; bouillon-ascite) et donnait des filtrats susceptibles d'amener la mort des lapins de 500 grammes, sous la peau, en 3-6 jours. Le staphylocoque Veillon est devenu avirulent pour le lapin (et le cobaye), peu pathogène pour la souris et pratiquement atoxique.

Depuis cette époque, les recherches de Borrel et Bridré (mammites des brebis laitières) ont révélé l'existence de germes très actifs et permis d'obtenir des sérums, dont nous analyserons ici les propriétés. On connaît, également, le mémoire de Kraus et Pribram sur la toxine et l'antitoxine staphylococciques. Il n'y avait, cependant, aucun document concernant la toxine et l'antitoxine des botryocoques ; nous espérons pouvoir combler, aujourd'hui, cette lacune.

Notre travail comprend 5 *parties* : *toxicité des filtrats* (staphylococciques et botryococciques) ; *toxicité* (et, du même coup, virulence) *des germes vivants* ; *action du sérum Bridré* (toxine et microbes) ; *identité des staphylocoques et des botryocoques* ; *vue d'ensemble sur les staphylocoques dorés.*

Nous avons utilisé les 17 échantillons minutieusement étudiés par Dumas (ainsi que quelques autres staphylocoques

et botryocoques). Afin d'éviter tout fléchissement de leur virulence et de leur toxicité, nous conservions, à la glacière, une grande provision de cultures (bouillon-ascite) de chaque germe, qui étaient repiquées le plus rarement possible.

Pour obtenir les *filtrats*, on ensemençait dans le bouillon-Martin glucosé (0,2 p. 100) et on passait sur Berkefeld après 5 jours d'étuve (37 degrés); pour obtenir les *microbes vivants*, on ensemençait des boîtes de Pinoy contenant de la gélose à la pomme de terre et on récoltait, le lendemain, la couche bactérienne.

Comme *animaux d'expérience*, nous avons choisi des lapins de 2.000-2.500 grammes et des cobayes (mâles) de 500-600 grammes.

Les *sérums*, que *M. Bridré* nous a obligeamment fournis, provenaient de moutons traités par les filtrats ou les germes vivants (mammites des brebis). Ils possédaient une activité quasi constante, quel que fût le staphylocoque ou le filtrat employé dans l'immunisation. Disons, de suite, qu'ils se sont montrés antitoxiques, mais non antimicrobiens.

Notons, également, que toxicité et virulence représentent des propriétés distinctes, bien que les échantillons toxigènes se rencontrent toujours chez les types virulents. Ajoutons, enfin, que, sur deux races incapables de donner de l'hémolysine, l'une sécrétait un poison très actif, l'autre n'en produisait pas du tout.

(*Nous emploierons, presque constamment, le terme staphylocoque, pour désigner et staphylocoques proprement dits et botryocoques.*)

TOXINE SOLUBLE

Nous prendrons, comme type de poison staphylococcique, celui que fournit l'échantillon le plus actif (mammite de la chèvre; origine Bridré). Il s'agit, avons-nous dit, de cultures en bouillon-Martin glucosé (0,2 p. 100), filtrées après 5 jours d'étuve. La toxine ainsi obtenue a été injectée aux *cobayes* et aux *lapins*, *dans les veines* et *sous la peau*.

Expériences sur les cobayes.

Injections intraveineuses.

2 cent. cubes tuent en 3-10 minutes, 1 cent. cube en 1/2 heure-2 heures ; 1/2 cent. cube amène la mort après 1/2 journée ou demeure inefficace (dose limite). Nous distinguerons les *3 types* suivants :

Mort en 3-30 minutes. — *Cliniquement.* Stupeur, exorbitisme, dyspnée, souvent paralysie du train postérieur. Puis, chute sur le côté, pauses respiratoires, convulsions, perte du réflexe cornéen, soif d'air, mort. — *A l'autopsie* : cœur généralement arrêté, d'habitude sans caillots ; congestion des viscères abdominaux ; poumons pâles ; sang se coagulant plus ou moins lentement (caillot mou, peu ou pas rétractile).

Mort en 2 heures. — *Cliniquement.* Hébétude, dyspnée, quelquefois parésie du train postérieur. L'animal reste couché sur le ventre, lequel est gros, tendu, sensible. Finalement, mort par arrêt respiratoire. — *A l'autopsie* : mêmes lésions que précédemment ; en plus : taches ecchymotiques habituelles au niveau de l'estomac et du gros intestin.

Mort en 6-12 heures. — *Cliniquement.* Poil piqué, stupeur croissante, ventre gros, sensibilité thoraco-abdominale. Puis, coma progressif, chute sur le côté, respiration d'abord intermittente, ensuite arrêtée. — *A l'autopsie* : congestion modérée des viscères abdominaux, taches nécrotiques des reins et surtout du foie (grisâtres, en jeu de patience).

Les *autres échantillons de staphylocoques* offrent une toxicité très diverse ; tantôt leurs filtrats tuent à peu près comme notre « poison-type », tantôt la dose limite s'élève vers 2 cent. cubes, ailleurs 2 cent. cubes ne déterminent que des accidents transitoires, ailleurs enfin plusieurs centimètres cubes se montrent inoffensifs.

Injections sous-cutanées.

La mort n'arrive jamais, même avec 3 cent. cubes (sauf dans le cas, assez rare, de complications — pneumocoque, *pasteurella*) ; 3 cent. cubes, 2 cent. cubes, 1 cent. cube et aussi 1/2 cent. cube engendrent une *eschare humide*. 10^{-1} cent. cube produit une lésion moins humide (passage au « type V »). 10^{-2} cent. cube ne détermine qu'un œdème peu durable.

Nous décrirons successivement : l'*eschare humide*, la forme de *transition avec le type V* et ce même *type V* (réalisé par les

filtrats moins actifs ou par la toxine forte chauffée à 100 degrés — voir plus loin).

Eschare humide. — *Dans la journée* : œdème mou, pouvant acquérir le volume d'un œuf; tache humide étendue, atteignant et dépassant même (suivant la dose) la surface d'une pièce de 5 francs, offrant un ton varié (bleu pâle, violet, vert pâle, mélangé) et cerclée de rouge-brun ou de lie de vin. — *Le lendemain* : empâtement plus marqué; tache revêtant l'aspect d'une « peau morte », de nuance différente selon les cas (ivoire sale, saumon terne, vert-grisâtre). — *Le surlendemain* : tuméfaction stationnaire ou en décroissance; eschare moins humide (parchemin mouillé). — *Le 4e jour* : œdème aplati et consistant; eschare brune et élastique. — *Puis* : formation d'un disque qui enchâsse la partie nécrosée; celle-ci, noir de jais, se soulève et tombe; ulcus atone, qui guérit 3 semaines après l'injection. Les animaux maigrissent plus ou moins.

Passage au type V. — *Dans la journée* : œdème mou, pouvant atteindre le volume d'un œuf de pigeon; tache bleue ou violette, bordée de rouge-brun, luisante (surface : 2 fr. et davantage). — *Le lendemain* : empâtement stationnaire; tache plus foncée et un peu humide. — *Le surlendemain*, la tuméfaction diminue, l'eschare brunit. — *Puis* : disque ferme, entourant la partie mortifiée sèche et noire; chute de celle-ci; ulcus, cicatrisé 15 jours après l'injection. Les animaux maigrissent peu.

Type V (V = tache violette). — *Dans la journée* : œdème mou, ne dépassant pas le volume d'une noix; tache de nuance variée (rose, violette, lie de vin, brunâtre, mélangée), sans humidité (surface : 1-2 fr.). — *Le lendemain* : empâtement stationnaire; tache brune. — *Le surlendemain*, la tuméfaction diminue, l'eschare noircit. — *Puis* : disque dur, enchâssant la portion nécrosée; chute de celle-ci; ulcus, qui guérit une dizaine de jours après l'injection. Emaciation nulle ou négligeable.

Les *autres échantillons* fournissent des filtrats d'une activité fort variable; on rencontre, en les étudiant, toute la gamme des lésions possibles, allant de l'eschare humide étendue à l'œdème transitoire discret.

Expériences sur les lapins.

Injections intraveineuses.

Nous ne décrirons que les effets de la « toxine-type ». 2 cent. cubes tuent en 5-10 minutes, 1 cent. cube en 1/4 d'h.-1/2 heure (rarement davantage); 1/2 cent. cube amène la mort en 12-20 heures ou demeure inoffensif (dose limite). — *Cliniquement* : mort par arrêt respiratoire, comme chez les cobayes; quelquefois diarrhée, 1 heure-1 h. 1/2 après l'injection. — *A l'autopsie* : congestion des viscères abdominaux, souvent

limitée au foie et à l'intestin grêle ; caillots intracardiaques plus fréquents que chez les cobayes.

Injections sous-cutanées.

[Toxine-type, ici encore.] Avec 1-2 cent. cubes, eschare humide très étendue ; mort habituelle (2 jours 1/2-7 jours) par infection pneumococcique ou pasteurellique. Avec 10^{-1} cent. cube, eschare humide moins marquée (et guérison) ou type V ou œdème transitoire (accompagné de rougeur cutanée).

Nous décrirons brièvement l'*eschare humide* et le *type V* (entre lesquels se trouvent des formes de passage).

Eschare humide. — *Dans la journée* : œdème nul ou peu accentué; tache étendue, pouvant couvrir une surface de 10 cent. sur 5 (et davantage), verdâtre ou saumonée, luisante, cerclée de rouge-brun ou de lie de vin. — *Le lendemain* : empâtement notable, le plus souvent; tache verte, humide, tantôt bordée de rouge brun ou de violet sombre, tantôt reposant sur un fond rouge vif ou livide. — *Le surlendemain* : tuméfaction énorme, d'habitude; eschare offrant l'aspect d'un parchemin mouillé. — *Le 4e jour* (quand l'animal résiste), l'eschare commence à sécher. — *Puis* — *Cas mortels* : à l'autopsie, exsudat jaune sale, infiltré de sérosité roussâtre (avec pneumocoque, *pasteurella* ou les deux, qui se retrouvent dans le sang du cœur). — *Cas curables* : l'eschare fonce ; l'empâtement se limite, durcit et devient discoïde : la partie mortifiée « saute », laissant à sa place un ulcus qui guérit lentement (après plusieurs semaines, d'habitude ; toujours forte émaciation).

Type V. — *Dans la journée* : œdème mou, ne dépassant pas le volume d'un œuf; tache rouge brique (surface : 2 fr. et davantage), sans humidité. — *Le lendemain*, l'empâtement s'aplatit et devient rénitent ; la tache brunit. — *Puis* : eschare noire, enchâssée par un disque ferme; ulcus... guérison 15 jours après l'injection. Les animaux maigrissent peu.

Le *chauffage à 55 degrés* (1/2 heure) diminue l'activité de la toxine. Ce fléchissement, peu appréciable lors des injections sous-cutanées, devient évident lors des injections intraveineuses (mort plus lente, pour une même dose).

Le *chauffage à 100 degrés* (5 minutes) altère notablement le poison. 3 cent. cubes ne tuent pas dans la veine et ne donnent que le type V sous la peau.

GERMES VIVANTS

Pour comparer la toxicité des microbes vivants avec celle des filtrats, nous avons injecté des quantités variables de cultures sur gélose à la pomme de terre (24 heures-37 degrés), émulsionnées dans l'eau physiologique.

Expériences sur les cobayes.

Injections intraveineuses.

Les *germes très virulents* tuent en 3-6 jours à la dose de 10^{-2}-10^{-3} centigramme.

Cliniquement. Emaciation progressive. Le lendemain ou le surlendemain de l'inoculation, mauvais état général, sensibilité thoracique et abdominale. Puis, affaiblissement croissant et, quelquefois, paraplégie. — *A l'autopsie*: nécroses du foie et des reins; abcès des reins et, rarement, du myocarde et du testicule; colonies nulles ou peu abondantes sur la gélose ensemencée avec le sang du cœur.

10^{-1} centigramme amène la mort après 2 jours environ (mêmes symptômes et lésions). Avec 1-2 centigrammes apparaissent les *phénomènes toxiques* aigus (les animaux succombent en 12-20 heures; staphylocoques plus ou moins abondants dans le sang du cœur).

Les *germes moins virulents* ne tuent qu'à des doses de plus en plus fortes; la survie peut atteindre 8-10 jours; les symptômes et lésions demeurent les mêmes. — Les *germes avirulents* sont impunément supportés (plusieurs centigrammes).

Injections sous-cutanées.

Les divers échantillons offrent une *toxicité* très variable, que traduisent les différences de réaction locale, pour la dose de 1 centigramme prise comme unité. A la limite, c'est un simple œdème transitoire; puis, un bourbillon, parfois minime; ensuite, un bourbillon compliqué d'eschare à type V; enfin, un bourbillon étendu et de plus en plus complètement recouvert par une eschare humide.

La *virulence* peut être affirmée (et mesurée) lorsque, vers le 3e-4e jour, on voit l'eschare initiale progresser excentriquement et doubler même dans certains cas. L'activité des germes devient alors frappante quand la dose inoculée était faible (10^{-2} centigramme).

Nous décrirons les *3 types* suivants :

Bourbillon. — *Dans la journée* : œdème mou, pouvant acquérir le volume d'un œuf de pigeon ; peau normale. — *Le lendemain*, la tuméfaction augmente habituellement d'étendue. — *Le surlendemain*, l'empâtement commence à diminuer et à durcir. — *Puis* : fluctuation, petite eschare (secondaire), ouverture, quelques gouttes de pus entourant un bourbillon jaunâtre qui s'élimine vite ; ulcus, cicatrisé 10-15 jours après l'injection virulente. Emaciation nulle ou négligeable. Parfois, pneumocoque ou *pasteurella* accompagnant le staphylocoque dans la lésion.

Bourbillon avec eschare à type V. — *Dans la journée* : œdème mou (*ut supra*) ; tache violette de nuance variable (surface : 0 fr. 20-1 fr.). — *Le lendemain*, l'empâtement augmente et la tache brunit. — *Le surlendemain*, la tuméfaction rétrocède, l'eschare prend une teinte noire. — *Puis* : disque dur, enchâssant la partie mortifiée qui se soulève et tombe ; ulcus, avec bourbillon dépassant les limites de l'eschare ; guérison 15-20 jours après l'inoculation. Les animaux maigrissent un peu.

Bourbillon de plus en plus recouvert par une eschare humide. — *Dans la journée* : œdème mou, dépassant souvent le volume d'un œuf de pigeon ; tache violette (de nuance variée) ou verdâtre ou brune et verte, toujours humide (surface : 2 fr. et davantage). — *Le lendemain* : empâtement plus étendu, quelquefois énorme ; tache humide, d'aspect différent suivant les cas (saumon sale, ivoire terne, parchemin mouillé), entourée d'un anneau brun-violet ou noirâtre. — *Le surlendemain* : tuméfaction stationnaire : eschare brune ou « peau morte » cerclée de noir. — *Le 4e jour*, l'œdème diminue et durcit ; l'eschare est toujours sèche à ce moment. — *Puis* : formation d'un disque qui entoure la partie nécrosée ; chute de celle-ci ; ulcus bourbillonneux... guérison 20-25 jours après l'injection. Les animaux maigrissent parfois beaucoup. — Les *complications* ne sont pas rares ; dans le cas le plus habituel, on voit l'œdème augmenter vers le 4e jour et la peau se couvrir de lividités ; l'eschare reste molle ; les sujets meurent presque toujours (*pasteurella*).

Quand on inocule des *échantillons très toxiques*, l'eschare, plombée et suintante, peut envahir toute la face antérieure de l'abdomen. La mort est presque fatale et survient rapidement, quelquefois en 24 heures (à l'autopsie : nécroses du foie et du rein). Ces échantillons sont généralement très virulents, d'où la présence ordinaire de staphylocoques dans le sang.

Expériences sur les lapins.

Injections intraveineuses.

Les *germes très virulents* tuent en 1-2 jours, à la dose de 10^{-1} centigramme et en 1/2 journée à la dose de 1-2 centigrammes.

Mort en 1-2 jours. — *Cliniquement.* Dans la journée, rien de spécial. Le lendemain, miction par regorgement; troubles mortels subits (dyspnée, convulsions, chute sur le flanc, arrêt de la respiration) ou bien stupeur, immobilité (sur le ventre), affaissement progressif et asphyxie lente. — *A l'autopsie* : distension énorme de la vessie; épanchements pleuraux et péricardique habituels; nécroses hépatiques et rénales; abcès des reins, du myocarde, des adducteurs de la cuisse; sang stérile le plus souvent.

Mort en 1/2 journée. — Mort par arrêt respiratoire. — Epanchement péricardique; liquide diarrhéique dans l'intestin grêle; foie pâle; congestion inconstante de la rate et du tube digestif; colonies plus ou moins abondantes sur la gélose ensemencée avec le sang du cœur.

Les *germes moins virulents*... les *germes avirulents*... (mêmes réflexions que pour les cobayes).

Injections sous-cutanées.

Mêmes types que chez les cobayes; nous nous bornerons donc à les décrire sommairement.

Bourbillon. — Empâtement, qui se limite et durcit; érythème passager des téguments. Peu de tendance à l'ouverture spontanée, d'où marche traînante. Staphylocoques dans les lésions jusqu'à la fin. Peu ou pas d'émaciation.

Bourbillon avec eschare du type V. — Œdème, tache rouge brique. Cette tache brunit, puis noircit; la tuméfaction devient plate et ferme. Chute de l'eschare, ulcus, exsudat jaune... cicatrisation assez lente. Les animaux maigrissent légèrement.

Bourbillon de plus en plus recouvert par une eschare humide. — *Dans la journée* : œdème généralement nul; tache violette ou verte atteignant l'étendue de 8 centimètres sur 2 (et davantage). — *Le lendemain* : empâtement plat et peu marqué; tache verte, humide, cerclée de lie de vin (surface : 20 centimètres sur 3 et davantage). — *Le surlendemain*, tuméfaction notable et rénitente, eschare offrant l'aspect du parchemin mouillé. — Le 4e *jour*, l'empâtement commence à diminuer, l'eschare sèche et brunit. — *Puis* : disque ferme enchâssant la partie nécrosée; chute de celle-ci, ulcus, exsudat jaune.... guérison progressive. Emaciation forte.

Les germes vivants n'apportent avec eux que peu de toxine *disponible*, comme va nous le montrer l'action de la chaleur.

Le *chauffage à 55 degrés* (1/2 heure) rend inoffensive l'injection intraveineuse de 1-2 centigrammes ; sous la peau, on n'obtient plus que le type V.

Le *chauffage à 100 degrés* (5 minutes) détermine exactement les *mêmes effets*. Il persiste donc, au sein des corps microbiens, des traces de poison que leur siège profond rend quasi indifférentes à l'influence thermique.

ACTION DU SÉRUM BRIDRÉ SUR LA TOXINE ET LES GERMES VIVANTS

Toxine.

Sérum préventif (la veille, dans les muscles gastrocnémiens).

Contre l'injection intraveineuse. — 2 cent. cubes de sérum rendent absolument inoffensif 1 cent. cube de toxine.

Contre l'injection sous-cutanée. — 4 cent. cubes de sérum ramènent au type V l'eschare engendrée par 1/2 cent. cube de toxine et en diminuent la surface ; ils ramènent au type, intermédiaire entre l'eschare humide et la forme V, la nécrose produite par 1 centimètre cube de toxine et en diminuent la surface. — 2 cent. cubes de sérum se comportent, vis-à-vis de 1/2 cent. cube de poison, comme 4 cent. cubes de sérum vis-à-vis de 1 cent. cube.

Sérum par mélange (1/2 heure de contact, température ordinaire).

Contre l'injection intraveineuse. — 1/2 cent. cube de sérum neutralise complètement 2 cent. cubes de toxine.

Contre l'injection sous-cutanée. — De même.

Sérum simultané (dans la veine — sous la peau le sérum demeure inefficace).

Contre l'injection sous-cutanée. — 2 cent. cubes de sérum ramènent au type V l'eschare engendrée par 1 cent. cube de toxine et en diminuent la surface.

Le sérum Bridré jouit donc de propriétés antitoxiques indéniables. Comme il fallait s'y attendre, il se montre plus actif par mélange que préventivement ou simultanément. Pourquoi, administré la veille, rend-il l'animal tout à fait réfractaire contre l'injection intraveineuse, si sévère et incomplètement contre l'injection sous-cutanée, bénigne en soi ? Il est facile de le comprendre. Lors de l'injection intraveineuse, on oppose un anticorps déjà « dilué » dans la masse de l'organisme à une toxine qui sera rapidement « diluée », elle aussi ; tandis que, lors de l'injection sous-cutanée, on oppose le même anticorps « dilué » à la toxine « concentrée » sur une faible étendue — toxine *peu résorbable*, car elle ne tue pas. Nous avons trouvé jadis, avec Loiseau et Forgeot, que l'administration préventive de sérum spécifique empêche toujours la mort des cobayes chez lesquels on introduit, par la voie hypodermique, le poison (*très résorbable*) du bacille Preisz-Nocard, mais ne neutralise point aussi aisément l'eschare locale. Dans ce cas, l'antitoxine diluée agit sans peine sur la toxine résorbée et diluée, difficilement et incomplètement sur la toxine demeurée *in situ* et plus concentrée. L'un de nous, avec Loiseau, a publié des faits de même ordre concernant le poison diphtérique ; ils s'expliquent pareillement.

Germes vivants.

Sérum préventif.

Contre l'injection intraveineuse (10^{-1} centigramme). — 2 cent. cubes de sérum demeurent inefficaces.

Contre l'injection sous-cutanée. — 2 cent cubes de sérum réduisent les dimensions de l'eschare (humide) qui succède à l'inoculation de 1/2 centigramme de germes.

Sérum par mélange.

Contre l'injection intraveineuse (10^{-1} centigramme). — 1 cent. cube de sérum reste sans effet.

Contre l'injection sous-cutanée. — 1 cent. cube de sérum ramène au type V l'eschare engendrée par 1 centigramme,

mais n'empêche pas la formation du bourbillon ; l'eschare peut même « repartir » le lendemain de l'injection et s'accroître légèrement.

Sérum simultané (dans la veine).

Contre l'injection sous-cutanée. — 1 cent. cube de sérum agit comme 2 cent. cubes, préventivement, pour 1/2 centigramme de germes; 2 cent. cubes, comme 1 cent. cube, par mélange, pour 1 centigramme.

Le sérum Bridré ne jouit donc pas de propriétés antivirulentes, au moins chez le cobaye et le lapin. Quand on inocule des germes vivants, il neutralise la toxine *disponible* et une fraction variable (selon les conditions expérimentales) de celle qui se trouve produite *in vivo* ; rien de plus.

IDENTITÉ DES STAPHYLOCOQUES ET DES BOTRYOCOQUES

Elle est *établie par trois ordres de faits.*

(1) Identité des caractères morphologiques, culturels et biologiques; identité des résultats obtenus *in vivo*, chez la souris (Dumas).

(2) Présence de *grains* types, dans les abcès du rein de nos cobayes, inoculés avec divers staphylocoques et botryocoques (voie intraveineuse); présence de grains types, dans le testicule des cobayes inoculés (localement) avec divers staphylocoques et botryocoques (Magrou).

(3) Identité des effets déterminés, chez le cobaye et le lapin, par l'injection des staphylocoques et des botryocoques ou de leurs toxines. Neutralisation de toutes ces toxines par le sérum Bridré *et par le sérum des chevaux atteints de botryomycose.*

Nous avons pu nous convaincre, en effet, que le sérum de deux chevaux, pris au hasard (champignon de castration et botryomycose généralisée), se comportait absolument comme le sérum Bridré; il n'était pas antimicrobien non plus.

C'est le second exemple connu d'un pouvoir antitoxique, chez les sujets affectés de maladies bactériennes chroniques. Le premier, fourni également par nous (avec Loiseau et Forgeot), concernait les chevaux atteints d'infections à bacilles de Preisz-Nocard.

Nous venons de parler de l'inoculation intratesticulaire des staphylocoques ou botryocoques. Elle permet de reproduire, avec la toxine introduite à l'état de germes vivants, la série entière des réactions possibles, depuis l'empoisonnement rapide et l'escharification massive (réalisés aussi par la toxine soluble) jusqu'au bourbillon et au granulome (inconnus pour les filtrats). La toxine « soluble » diffuse très vite et tout se joue presque immédiatement ; la toxine « solide », émise pendant une durée variable et en quantité variable dans l'unité de temps, peut déterminer non seulement des effets brutaux, mais encore des effets de plus en plus ménagés, comme nous allons le voir.

Quand on injecte, par la voie intratesticulaire (cobaye), des dilutions de richesse décroissante (staphylocoques ou botryocoques), l'animal qui reçoit la dose maxima meurt après quelques heures ; le second fait une eschare humide (orchite « gangréneuse », si l'on veut employer la dénomination fautive servant à caractériser les mammites correspondantes) ; le troisième, un abcès (plus exactement, un bourbillon) ; le quatrième, un abcès (bourbillon) avec des *grains* ; le cinquième, un granulôme (cellules épithélioïdes et géantes). Nous avons schématisé quelque peu les résultats, mais les choses se passent ainsi, *grosso modo* (expériences de Magrou). On saisit bien l'importance de la *vitesse de réaction, au regard d'une toxine toujours la même.*

VUE D'ENSEMBLE SUR LES STAPHYLOCOQUES DORÉS

Voici, d'après les recherches des auteurs, celles de Dumas et les nôtres, l'idée qu'on peut se faire actuellement du groupe des staphylocoques dorés.

Les staphylocoques dorés jouissent d'une *grande ubiquité*. On les rencontre dans le *milieu extérieur* et à la surface de la *peau* et des *muqueuses* (de l'homme et des animaux sains).

Ils occasionnent, chez l'homme : le furoncle, l'anthrax, l'impétigo, l'ecthyma, divers types de folliculites ; des abcès superficiels, profonds et viscéraux ; des catarrhes purulents des muqueuses et des épanchements purulents des séreuses ; l'ostéomyélite classique ; la pyohémie (presque inconnue aujourd'hui). *Ils déterminent, chez les animaux* : des suppurations variées ;

des mammites « gangréneuses » (brebis, chèvre) ; la botryomycose (cheval — les cas *authentiques* de botryomycose humaine semblent bien rares). Suivant les conditions de l'infection naturelle, ils produisent *localement* des nécroses, des suppurations ou des granulomes. Ils peuvent aller former *au loin* des foyers métastatiques, mais ne provoquent jamais de septicémie vraie. Par leurs propriétés toxigènes, ils engendrent diverses *altérations viscérales*, aiguës ou chroniques (parmi ces dernières, la dégénérescence amyloïde).

Ce sont, d'ordinaire, des *cocci*, régulièrement arrondis et prenant le Gram. Dans les *grains* botryomycotiques, ils s'élèvent en organisation, grâce à une symbiose avec les éléments des tissus, perdent leur caractère univoque et revêtent l'aspect de *myxobactéries* véritables, comme cela se voit, d'ailleurs, pour tous les grains, quel que soit le microbe causal. (Les recherches de Pinoy et de Magrou imposent la conception précédente.)

Ils se développent abondamment *in vitro*, produisant un *pigment* d'intensité variable. Ils liquéfient la gélatine, coagulent le lait, fermentent divers sucres et sécrètent habituellement de l'*hémolysine*.

Ils tuent presque toujours la *souris* sous la peau (cultures du sang positives), assez souvent le *cobaye* et le *lapin* dans les veines (affaire de dose et, surtout, de virulence). Chez le cobaye et le lapin, l'*injection hypodermique* peut déterminer les lésions suivantes (gamme montante) : simple œdème ; bourbillon ; bourbillon, avec eschare du type V ; bourbillon, avec eschare humide (celle-ci susceptible, parfois, de progresser momentanément) — l'*injection intraveineuse* peut amener la mort plus ou moins vite (abcès du rein, du myocarde, des muscles ; nécroses rénales et hépatiques ; cultures du sang positives dans le cas d'issue précoce).

Suivant son activité, la *toxine staphylococcique* engendre, sous la peau : l'œdème, l'eschare du type V, l'eschare humide ; dans les veines, les bons filtrats font périr rapidement les animaux, par un mécanisme que nous étudierons ailleurs. Le poison fléchit déjà vers 55 degrés et s'altère beaucoup vers 100 degrés. Quand on l'administre à l'état de germes vivants, on peut voir apparaître, lors des injections hypodermiques, la

lésion bourbillon, caractéristique des toxines « solides » et inconnue avec les toxines « solubles » — on peut voir apparaître, lors des injections intraveineuses, les foyers métastatiques, analogues, eux aussi, aux bourbillons — on peut voir apparaître, enfin, lors des injections intratesticulaires, bourbillons ou granulomes, selon la vitesse réactionnelle.

Le sérum Bridré et celui des chevaux atteints de botryomycose n'offrent que des propriétés antitoxiques. Il n'existe point, actuellement, de sérums antimicrobiens correspondants (du moins, que nous sachions).

Quelle idée doit-on se faire des *staphylocoques blancs*? Ce sont des germes chez lesquels la disparition de la fonction chromogène va *souvent*, *mais non forcément*, de pair avec le fléchissement de la toxicité et de la virulence. Mlle Raphaël (recherches inédites), comparant des staphylocoques dorés et blancs, qui coexistaient dans les mêmes pus (abcès du sein, infections ombilicales des nouveau-nés; origine Durante), a toujours vu les seconds rester bien au-dessous des premiers comme pouvoirs toxigène et pathogène. Par contre, Bürgi a isolé des *albi* très actifs chez des lièvres naturellement infectés.

Le *staphylocoque citrin* ne *semble* différer de l'*aureus* que par la nuance des colonies (recherches inédites de Mlle Raphaël).

Le *staphylocoque hémorragique* de Klein, c'est le staphylocoque de Borrel et Bridré occasionnant, non plus la mammite, mais la vulvite « gangréneuse » des brebis (*post partum*); il détermine, chez les individus qui dépècent les animaux infectés, des panaris phlycténulaires très étendus.

La question des staphylocoques, déjà fort avancée, le sera encore beaucoup plus quand on aura approfondi l'étude des *tétragènes*. On souhaite vivement de savoir s'il s'agit de germes identiques ou différents.

RECHERCHES HISTOLOGIQUES

SUR LES GLANDES SALIVAIRES DANS LA RAGE

par Y. MANOUÉLIAN

(de l'Institut Pasteur.)

(Avec les planches X et XI.)

De l'existence des corpuscules de Negri dans les ganglions nerveux des glandes salivaires.

Depuis Negri, on sait qu'il existe, dans le système nerveux central — dans la corne d'Ammon notamment — des animaux atteints de rage, des corpuscules spécifiques, souvent mûriformes, siégeant dans le cytoplasme des cellules nerveuses. Ces corpuscules étant presque constants présentent une grande valeur pour le diagnostic de cette maladie.

Nous nous sommes demandé si ces corpuscules existaient dans les glandes salivaires des animaux enragés ; nous avons examiné à cet effet la glande sous-maxillaire et la parotide chez un assez grand nombre de sujets. Nous relaterons pour le moment nos recherches faites chez une vingtaine de chiens dans le cours de la *rage des rues* (1).

Nous affirmons qu'il n'existe pas de corpuscules dans le parenchyme glandulaire : cellules des acini et des canaux excréteurs ; mais on en trouve toujours et en grand nombre dans le cytoplasme des cellules nerveuses des ganglions qu'on rencontre constamment dans le tissu interstitiel de ces glandes (planche X, fig. 1).

Il y a pourtant des causes d'erreur sur lesquelles nous tenons à insister : la confusion possible, par les chercheurs peu

(1) Y. Manouélian, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 10 novembre 1913, p. 866 et 1er décembre 1913, p. 1089.

Pour la technique employée, voir notre travail dans les *Annales de l'Institut Pasteur*, décembre 1912, p. 974. Par suite d'un mauvais repérage, les figures qui accompagnent ce mémoire ne donnent qu'une idée incomplète et même inexacte des beaux dessins exécutés par M. Constantin, l'artiste dessinateur.

avertis, des corpuscules d'origine leucocytaire et de débris de cellules glandulaires avec les corps de Negri.

En effet, chez les chiens atteints de rage des rues on constate une invasion considérable de leucocytes polynucléaires dans les acini et les canaux excréteurs. Ces éléments se détruisent vite : leur noyau se fragmente en granulations qui présentent des vacuoles et des sphérules dans leur intérieur et, de basophiles qu'elles étaient, deviennent acidophiles (planches X et XI, fig. 3 et 9). La méthode de Mann les colore alors en rouge ; puis ces granulations deviennent de plus en plus pâles. Nous suivrons bientôt toutes les phases du processus qui aboutit en certaines régions à la transformation complète du parenchyme glandulaire. Pour le moment, mettons en garde les auteurs qui, après un examen superficiel, pourraient prendre ces débris d'origine nucléaire pour des corpuscules de Negri.

Il existe aussi d'autres formations plus rares, de volume plus considérable, qui pourraient donner le change. Il s'agit de résidus de cellules glandulaires ayant subi la dégénérescence hyaline. On y constate l'existence d'inclusions rappelant celles des corpuscules de Negri.

Comme nous l'avons dit, dans les glandes salivaires il existe de nombreux centres nerveux : les uns microscopiques, les autres visibles à l'œil nu sur des coupes colorées ; tous ces ganglions sont composés de cellules à type sympathique. Or, nous savons que dans la rage, les ganglions sympathiques présentent comme les ganglions cérébro-spinaux — à un degré moins marqué toutefois — diverses lésions dégénératives des cellules nerveuses, et surtout les lésions décrites pour la première fois par van Gehuchten et Nélis. Il s'agit d'une invasion de mononucléaires qui finissent par détruire et faire disparaître la cellule nerveuse altérée sous l'influence du virus rabique et s'installent à sa place ; dans les ganglions nerveux des glandes salivaires, on peut rencontrer ces lésions.

De plus, nous savons qu'il existe des corpuscules de Negri dans les ganglions spinaux ainsi que dans les ganglions sympathiques. Dans nos coupes de glandes salivaires rabiques le cytoplasme des cellules nerveuses renfermait un grand nombre de corpuscules de Negri, alors que nous n'en avons jamais

observé dans les cellules glandulaires, ni dans la lumière des acini, ni dans celle des canaux excréteurs.

Nous ferons remarquer un fait qui montre combien ces corpuscules sont particuliers aux cellules nerveuses. Dans les troncs nerveux qui accompagnent les vaisseaux des glandes, on trouve par places de petits amas de cellules nerveuses et même une cellule nerveuse unique ; le cytoplasme seul de l'élément nerveux contient des corpuscules de Negri à l'exclusion de tous les tissus constituants de ces glandes (planche X, fig. 2).

Étude de la destruction des acini.

Les acini sont le siège de modifications profondes et très importantes ; nous allons en étudier en détail le mécanisme.

Invasion des polynucléaires, leur destruction, et phagocytose par des macrophages de tout le contenu acinien : voilà les différentes phases du processus qui aboutit à la transformation complète des acini en un amas de macrophages.

En effet, dans une première phase, on constate la pénétration de leucocytes polynucléaires dans les cellules des acini. L'existence de ces leucocytes est bien éphémère ; probablement sous l'influence du virus rabique ils se désagrègent vite, leur noyau se fragmente et se réduit en quelques granulations. Cette destruction de polynucléaires paraît un fait important, indispensable pour l'accomplissement du cycle complet de la phagocytose. Il semble que, pour être phagocytées par les macrophages, les cellules des acini ont besoin d'être fortement touchées et sensibilisées par la ou les substances que la polynucléolyse mettrait en liberté. Car *c'est juste en ce moment* que ces cellules, qui généralement jusqu'alors présentaient des altérations relativement peu considérables, accusent des lésions graves ; à la suite de la destruction de leur noyau, elles se trouvent réduites à des masses parsemées de granulations (pl. X, fig. 3). On assiste alors à l'un des plus remarquables exemples de phagocytose.

Certains éléments mononucléaires des macrophages d'une plasticité très grande dont le cytoplasme contient de fines et nombreuses granulations basophiles, s'attaquent aux éléments

qui s'y trouvent, restes de cellules aciniennes et débris de polynucléaires, les incorporent et les digèrent (pl. X et XI, fig. 6, 8 et 9). Pendant cette période d'activité, il n'est point rare de rencontrer dans les acini des macrophages en division mitotique (pl. X, fig. 4).

La voracité de ces éléments est telle qu'ils ne s'attaquent pas seulement aux débris cellulaires, mais même aux polynucléaires peu modifiés quant à leur forme.

Pendant cette phagocytose, l'aspect des macrophages est frappant : chez un grand nombre, le noyau est refoulé tout à fait vers la périphérie, une mince bande de cytoplasme entourant le corps englobé ; il en est qui présentent des cloisons cytoplasmiques, formant ainsi des cavités où se trouvent ces corps.

Toutes les cellules des acini finissent par subir le même sort ; il arrive ainsi un moment où on ne trouve dans les acini que des macrophages en train de digérer les éléments englobés. Une fois l'acte de phagocytose terminé, le cytoplasme se condensant autour du noyau, ces macrophages deviennent plus ou moins ovoïdes : c'est leur forme de repos. Il existe des acini où on ne trouve que de pareilles cellules groupées ensemble. La transformation est complète ; de l'acinus glandulaire il n'existe nulle trace, les macrophages y ayant pris droit de cité. Il y a des régions où, à la suite de la destruction du tissu conjonctif périacineux, un grand nombre d'acini ainsi transformés se confondent ensemble, et on se trouve en présence de zones où l'histologiste le plus compétent dans la matière ne pourrait soupçonner qu'il a sous les yeux une coupe de glande salivaire (pl. XI, fig. 9, partie centrale).

Quelles sont les modifications des canaux excréteurs ?

Comme dans les acini, les leucocytes polynucléaires pénètrent dans les cellules épithéliales des canaux excréteurs en creusant des vacuoles dans le cytoplasme ; il existe à ce niveau un certain degré de polynucléolyse, mais ici le processus est beaucoup plus discret. Ce qu'il y a de remarquable, c'est le passage des polynucléaires en très grand nombre dans la lumière du canal où la polynucléolyse devient plus intense. Un fait important et fréquent aussi, c'est la chute des cellules glandulaires dans la lumière ; on y rencontre un certain nombre de

cellules aciniennes facilement reconnaissables à leur structure aréolaire, et surtout des cellules propres des canaux (pl. X, fig. 5).

Cellules aciniennes, cellules des canaux excréteurs, *un nombre fort considérable de polynucléaires*, quelques macrophages et des masses amorphes se colorant fortement en bleu par le bleu polychrome de Unna, en violet par la méthode de Mann, voilà ce qui constitue les éléments figurés de la bave chez le chien atteint de rage des rues.

Conclusions.

De l'ensemble de nos recherches sur les glandes salivaires chez le chien dans la rage des rues, il résulte :

1° Qu'il existe des corpuscules de Negri, et en grand nombre, seulement dans le cytoplasme des cellules nerveuses des ganglions intraglandulaires, et jamais dans les cellules épithéliales des acini, ni dans celles des canaux excréteurs ;

2° Les cellules aciniennes sont le siège d'altérations profondes, leur débris sont phagocytés par les macrophages qui s'installent à leur place, de sorte que, finalement, les acini ne sont représentés que par des amas de macrophages ;

3° Quant à la bave, nous venons de voir quels en sont les éléments figurés.

15 Décembre 1913.

EXPLICATION DES PLANCHES X et XI

Sauf la figure 7, qui représente une coupe de glande sous-maxillaire dans la rage humaine, tous les autres dessins proviennent des coupes de glandes salivaires rabiques de chien. Les figures 6, 7 et 8 se rapportent à des préparations colorées au bleu polychrome de Unna; quant aux autres figures, elles représentent des coupes traitées avec la méthode de Mann.

Fig. 1. — Portion de ganglion nerveux intraparotidien. Grossissement 700 diamètres. On voit des corps de Negri dans le cytoplasme des cellules nerveuses.

Fig. 2. — Coupe de la parotide. 600 diamètres. Acini normaux et altérés. Il existe aussi deux cellules nerveuses contenant des corps de Negri ; l'une des cellules se trouve immédiatement à côté d'un tronc nerveux.

Fig. 3. — Polynucléolyse au niveau des acini. 720 diamètres.

Fig. 5. — Coupe de canal excréteur. 800 diamètres.

Fig. 7. — Coupe de glande sous-maxillaire dans la rage humaine. 110 diamètres.

Fig. 4. — 100 diamètres, figures 6 et 8, 900 diamètres ; figure 9, 800 diamètres. Phénomènes phagocytaires dans les acini. On voit en outre à gauche de la figure 9 un certain degré de polynucléolyse dans les acini.

ESSAIS DE CHIMIOTHÉRAPIE

COMBINAISONS DES SELS D'ARGENT ET DES COMPOSÉS ARSENICAUX DANS LE TRAITEMENT DES TRYPANOSOMIASES EXPÉRIMENTALES ET DE LA SYPHILIS CHEZ L'HOMME

par J. DANYSZ

Une série d'études sur les propriétés antiseptiques de différents sels métalliques, et ensuite sur l'action de ces sels sur le sang normal et les sérums spécifiques m'ont amené à conclure que de tous ces produits, les sels d'argent possèdent la plus grande puissance microbicide par rapport à leur toxicité et modifient le moins les propriétés normales du sang et des sérums spécifiques, antitoxiques ou antimicrobiens.

Ainsi, j'ai pu constater que les dilutions à 1/10.000 ne modifient en rien les propriétés des sérums antidiphtérique, antipesteux ou antityphique, que les dilutions à 1/1.000 n'exercent aucune action appréciable sur les éléments du sang.

Orfila donnait aux chiens 4,38 grammes (un drachme) de nitrate d'argent en pilules, par jour, pendant quatre jours de suite sans observer d'accidents appréciables. Charcot, qui a fait en même temps que Vulpian, Cruveilhier et d'autres de nombreux essais sur l'action physiologique et thérapeutique des sels d'argent sur l'homme, écrit à ce sujet (1) :

« Le fait capital qui ressort de nos observations sur ce point, c'est la *tolérance* de l'économie pour cet agent médicamenteux. »

Ces savants n'ont jamais observé de cas d'empoisonnement proprement dits et les cas d'*argyrie* n'étaient observés qu'après l'absorption de 30 grammes de nitrate d'argent. Ils ont noté, par contre, qu'un traitement prolongé par ce produit peut très favorablement influencer certaines affections nerveuses qui,

(1) Charcot et Ball, *Encyclopédie des sciences médicales* de A. Dechambre, t. VII, p. 57.

nous le savons aujourd'hui, sont dus à l'infection par les spirochètes.

Je me suis donc attaché avant tout à l'étude des propriétés thérapeutiques des sels d'argent et notamment de l'azotate, mais j'ai reconnu bien vite que, sous cette forme, c'est-à-dire à l'état de sel pur, l'argent ne pouvait donner que des résultats peu appréciables. En effet, introduit dans l'organisme en solutions très étendues (1/80.000 à 1/100.000), il n'influence pas sensiblement les infections microbiennes, et en solutions plus concentrées il se fixe sur les tissus avec plus d'énergie, de sorte que le résultat est le même, avec cette aggravation dans le dernier cas que, employé en injections intraveineuses, le nitrate d'argent produit des durcissements des veines sur une assez grande étendue à partir du point d'introduction et parfois des accidents plus graves pouvant amener à la longue l'atrophie complète de ces vaisseaux.

J'ai alors cherché à combiner l'argent à d'autres substances possédant des affinités spéciales pour certains micro-organismes et à l'obtenir sous forme dissimulée de façon à diminuer son affinité pour les tissus.

Tout d'abord, j'ai cherché à combiner l'argent avec des couleurs d'aniline et j'ai constaté qu'en ajoutant une solution de nitrate d'argent à une solution d'éosine, on obtient un précipité qui se redissout par l'addition de chlorure de sodium. La quantité de NaCl qu'il faut ajouter pour dissoudre le précipité est proportionnelle à la quantité d'argent fixé.

L'argent est donc dissimulé dans ce composé, mais sa fixation n'est pas très solide, ni très stable. Le précipité séché ne se redissout plus dans l'eau salée.

En solution très étendue (1/50.000 à 1/100.000), ce composé m'a permis de traiter avec succès le chancre syphilitique de quatre lapins qui m'ont été obligeamment cédés par M. Levaditi. Deux ou trois injections dans les veines, de 0,20 milligramme (10 à 20 cent. cubes de liquide) chacune, guérissaient en trois semaines de très gros chancres syphilitiques. Les tréponèmes disparassaient quatre ou cinq jours après le début du traitement et on constatait en même temps un ramollissement du pourtour induré du chancre.

J'ai obtenu des résultats analogues chez quatre singes (rhesus)

chez lesquels on a provoqué la formation de chancres syphilitiques sur l'arcade sourcilière avec le virus humain.

Essayé dans la paralysie générale d'origine syphilitique, par le Dr Auguste Marie et moi, le même composé nous a donné les résultats suivants :

Trois malades de l'asile de Villejuif ayant donné une réaction de Wassermann positive ont reçu trois injections de 5 milligrammes chacune dans 250 cent. cubes d'eau distillée à huit jours d'intervalle.

Un quatrième malade a reçu quatre de ces injections dans les mêmes conditions. Donc les trois premiers ont reçu 15 milligrammes, le dernier 20 milligrammes d'éosinate d'argent en tout.

Trois mois après ce traitement, on a essayé sur tous les malades de l'asile atteints de paralysie générale, la réaction à la luétine et on a constaté une différence bien marquée en faveur de tous les malades traités par nous. Les trois premiers ont montré une réaction fortement atténuée, le quatrième, une réaction négative.

Essayés au Wassermann, le sérum des premiers était encore positif, celui du dernier négatif.

L'état général n'a pas été modifié d'une façon appréciable.

Ce même composé m'a donné aussi des résultats intéressants à noter dans l'orchite tuberculeuse des lapins.

Exp. I. — En injectant dans les testicules des lapins une émulsion très épaisse (environ 1 milligramme) d'une culture de tuberculose peu virulente (culture *Test*, de l'Institut Pasteur), on voit apparaître, après 7 à 10 jours, des nodules qui deviennent de plus en plus volumineux, de sorte que bientôt l'animal ne peut plus rentrer ses testicules.

Chez un de ces lapins (n° 56, poids 2 kilogr. 890), on commence le traitement 7 jours après l'inoculation et il reçoit d'abord tous les deux jours dans les veines des oreilles 3 injections de 0,25 milligramme d'éosinate d'argent dans 10 cent. cubes d'eau physiologique et, 20 jours après, 5 autres injections de 0,25 à 0,5 milligramme tous les 8 à 10 jours.

Au début, jusqu'au 20e jour après l'inoculation, les testicules augmentaient de volume. A partir du 23e jour, on constate une diminution sensible qui s'accentue après chaque injection, de sorte que deux mois après l'inoculation, l'animal peut de nouveau rentrer ses testicules et on ne sent au toucher que quelques très petits nodules dans un épididyme. L'autre testicule ainsi que l'épididyme semblent revenus à l'état normal.

On cesse alors les injections, et deux mois plus tard on voit l'orchite réapparaître de nouveau sous la même forme.

Cinq mois et demi après l'inoculation, le lapin pèse 3 kilogr. 270, il y a

donc augmentation de poids de près de 500 grammes, il est alors sacrifié et on ne trouve de lésions tuberculeuses nulle part ailleurs que dans un testicule. La tuberculose ne s'est pas généralisée.

Le lapin n° 57 (2 kilogr. 570) a été traité de la même façon, mais le traitement n'a commencé qu'un mois après l'inoculation, et il n'a reçu que 5 injections en tout. Il est mort deux mois après, de la pasteurellose. Trois jours avant la mort, il pesait 2 kilogr. 820. A l'autopsie, on n'a trouvé que quelques tubercules dans les poumons et dans les testicules, rien dans les autres organes.

Le témoin n° 54 (2 kilogr. 920) est mort en 4 mois avec des testicules énormes et tuberculose généralisée après avoir perdu plus de la moitié de son poids (1 kilogr. 760). Un autre témoin (le n° 55) (2 kilogr. 860) est mort en 6 semaines. Testicules très volumineux caséifiés, tuberculose généralisée.

Dans tous ces cas, les veines injectées ont encore été gravement atteintes, mais les résultats obtenus étaient assez encourageants pour justifier la recherche d'un composé dans lequel l'argent serait encore mieux dissimulé que dans sa combinaison avec l'éosine. Ces recherches, dans lesquelles j'ai mis à profit les entretiens que j'ai eus sur ce sujet avec M. Louis Fournier et ses collaborateurs MM. Dalimier, Guenot, Lancereaux et Lesage, devaient tout naturellement conduire à l'idée d'associer l'argent à des composés qui ont déjà fait leurs preuves comme agents thérapeutiques puissants.

J'ai pensé tout d'abord à la série des arsenicaux, le cacodylate de soude, l'atoxyl et enfin le dioxydiaminoarsénobenzol mis en valeur par les travaux d'Armand Gautier, Laveran, Thomas, Kopke, Louis Martin, R. Koch, Salmon et dans ces derniers temps surtout par Ehrlich et ses nombreux élèves et collaborateurs.

Il serait sans intérêt de décrire ici les détails de toutes ces combinaisons et des essais que j'ai été amené à faire, parce que les dernières de cette série, les combinaisons des sels d'argent et de dioxydiaminoarsénobenzol, m'ont donné des résultats supérieurs à toutes les autres.

Je me bornerai donc à signaler qu'en ajoutant une solution d'éosinate d'argent à une solution d'atoxyl, on obtient un produit qui reste soluble dans l'eau et dans lequel par conséquent l'argent et l'arsenic sont dissimulés, tandis que l'atoxylate d'argent est un simple sel insoluble dans l'eau et qu'on ne peut employer qu'en émulsion huileuse, et je passerai de suite à la

description des composés de sels d'argent et de dioxydiamino-arsénobenzol.

Composés de chlorure, bromure ou iodure d'argent et de dioxydiaminoarsénobenzol.

Pour combiner l'argent au dioxydiaminoarsénobenzol, le plus simple était de mélanger une solution de nitrate d'argent avec une solution aqueuse de chlorhydrate de dioxydiamino-arsénobenzol.

En opérant ainsi, j'ai obtenu une liqueur limpide plus ou moins foncée, suivant la quantité d'argent introduite, dans laquelle l'argent était évidemment dissimulé.

En traitant ce liquide par le chlorure de sodium ou un autre électrolyte, on obtient un précipité floconneux et, en dosant l'acidité du liquide surnageant, on constate que la réaction n'a subi aucune modification appréciable.

Quand on traite ce composé par l'acide sulfurique, on obtient un précipité jaune clair très abondant et le liquide qui surnage ne contient que des traces d'arsenic et d'argent.

Ces faits tendent à prouver que l'argent et le chlore ont été fixés par le dioxydiaminoarsénobenzol.

Cette fixation du chlore, qui par lui-même ne joue aucun rôle dans la thérapeutique, m'a alors donné l'idée de le remplacer par le brome ou par l'iode, qui possèdent l'un et l'autre des propriétés spécifiques très prononcées, et j'ai reconnu qu'en mélangeant des solutions de bromure et d'iodure d'argent dans le cyanure de potassium avec une solution de dioxydiamino-arsénobenzol, on obtenait des composés analogues aux précédents dans lesquels, par conséquent, l'argent, le brome et l'iode étaient fixés et dissimulés.

La préparation de ces produits a été décrite dans les *Comptes rendus de l'Académie des Sciences* du 19 janvier 1914.

L'analyse des produits obtenus à l'état sec a donné :

Produit bromé : Ag, 10,06; Br, 8.14; As, 26,99; SO^4H^2, 16,10 p. 100.
Produit iodé : Ag, 10,50 ; I, 11,47; As, 26,80; SO^4H^2, 15,97 p. 100.

Dans toutes ces préparations, j'avais été très utilement aidé

par M. Ch. Digaut, ingénieur-chimiste, attaché à mon laboratoire.

J'ai cherché avant tout à en étudier et déterminer les propriétés antiseptiques et thérapeutiques, laissant pour plus tard l'étude de la nature chimique de ses composés, qui paraît être très particulière.

Cette étude a été entreprise dans mon laboratoire par le Dr Kozniewski, privat-docent de l'Université de Cracovie.

Mes premières expériences avec les composés arséno-argentiques étaient déjà faites quand j'ai eu connaissance de la conférence faite par M. Ehrlich au Congrès de médecine de Londres (8 août 1913). M. Ehrlich dit dans cette conférence, entre autres choses, ce qui suit :

« Les indigènes de quelques pays sauvages avaient l'habitude, pour mieux tuer leurs ennemis, d'enduire les fers de leurs flèches, non pas avec un seul, mais avec deux ou trois poisons différents, et il nous a semblé utile d'imiter ce procédé dans la lutte avec les parasites et d'empoisonner nos flèches synthétiques non pas une seule, mais deux fois. En collaboration avec le Dr Karrer, j'ai réussi à fixer encore des métaux sur les arsenicaux réduits (par exemple le salvarsan) et à obtenir ainsi des médicaments qui se sont montrés dans les expériences de laboratoire d'une valeur thérapeutique plus élevée. »

Il est donc certain, et je le reconnais volontiers, qu'Ehrlich avait eu l'idée de ces combinaisons bien avant moi et j'en ai eu la preuve quand j'ai appris (en novembre 1913) par mon collègue M. Fourneau, auquel je dois quelques conseils très utiles pour mes préparations, qu'Ehrlich a fait breveter un composé de dioxydiaminoarsénobenzol et d'azotate d'argent.

Ce brevet avait été déposé déjà en 1912 et affiché à la fin de septembre 1913.

Deux mois après la publication de ma première note (1) sur ce sujet, M. Ehrlich a eu l'amabilité de m'écrire que le Dr Karrer, qui s'est plus spécialement occupé des combinaisons des arsenicaux avec les métaux, a pu démontrer que dans le dioxydiaminoarsénobenzol, les métaux se fixaient sur l'arsenic, et dans une deuxième lettre datée du 3 janvier 1914, qu'il a fait bre-

(1) *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences.* Séance du 20 octobre 1913.

veter également les combinaisons de ses arsenicaux avec l'or, le platine, l'iridium, le cuivre, etc.

Le grand savant m'annonce en même temps que Mlle Leupold a fait des essais de son composé cuprique dans une trypanosomiase (race de Morgenroth) et qu'elle a pu guérir des souris de 20 grammes par des doses de 0,02 milligramme et en injectant simultanément 1/400 à 1/600 de trypanobleu, par les doses 0,007 à 0,008 milligramme par kilogramme.

Entre temps (en décembre 1913), j'ai reçu aussi « une communication préliminaire » de M. F. van den Branden, qui a traité avec succès à Léopoldville quelques cas de maladie du sommeil par le même composé cuprique, mais M. van den Branden dit en même temps que ce composé s'est montré quelquefois instable au moment de sa préparation et qu'une injection de 2 décigrammes a causé la mort d'un malade de 45 kilogrammes sur 35 cas traités. Le cas de mort était dû à l'intoxication arsenicale.

Pour résumer l'historique de cette question, je puis donc dire que — m'inspirant des anciens travaux sur les propriétés physiologiques, thérapeutiques et surtout antiseptiques des sels d'argent et des travaux plus récents de Laveran, Mesnil et Nicolle, Ehrlich, Morgenroth, etc., sur les effets de l'association de différents médicaments dans le traitement des trypanosomiases, et mettant largement à profit les travaux d'Ehrlich et de ses élèves sur la chimiothérapie moderne — j'ai eu l'idée des mêmes combinaisons que le grand savant allemand indépendamment de lui, et tout en suivant une voie différente de celle qu'il a suivie lui-même.

En outre, habitué à expérimenter avec des produits biologiques dont la composition nous est complètement inconnue, mais dont nous constatons très bien les effets, je ne me préoccupais pas tout d'abord de connaître la nature chimique exacte de mes composés. Je cherchais avant tout à établir leur valeur au point de vue thérapeutique, et j'ai pu publier les premiers résultats de mes recherches avant toute autre publication scientifique de ce genre.

Les essais que j'ai pu faire avec les composés des arsenicaux d'Ehrlich et d'autres métaux, tels que le mercure, l'or et le

platine, me permettent de supposer, ainsi que je l'ai déjà indiqué ailleurs (1), que ce sont les composés arséno-argentiques qui donnent les produits les plus stables et les plus actifs par rapport à leur faible toxicité.

Je dois ajouter que les composés arséno-argentiques peuvent encore être associés, de même que le composé cuprique d'Ehrlich, au trypanobleu, trypanorouge (2) ou tryparosan et que cette association augmente beaucoup leur activité thérapeutique dans certaines trypanosomiases.

ESSAIS THÉRAPEUTIQUES

J'ai essayé les composés arséno-argentiques dans les maladies suivantes :

1° Trypanosomiases et notamment le *Surra* (du laboratoire de Mesnil), le *Tr. rhodersiense* et *dimorphosn* (du laboratoire de Laveran);

2° Spirilloses, *Spir. des poules* (du laboratoire de Marchoux);
Spir. de la fièvre récurrente (du laboratoire de Mesnil);
Syphilis expérimentale des lapins (du laboratoire de Levaditi et du laboratoire de L. Fournier, de l'hôpital Cochin);
Syphilis de l'homme (service de L. Fournier, à l'hôpital Cochin);

Pour éviter les longues dénominations, j'appellerai :

A C A, le dioxydiaminoarsénobenzol chloroargent-argentique;

A B A, le dioxydiaminoarsénobenzol bromo-argentique;

A I A, le dioxydiaminoarsénobenzol iodo-argentique.

La proportion de chlorure, de bromure ou d'iodure d'argent combiné sera désignée par un chiffre. Ainsi, par exemple, la combinaison d'une molécule de chlorure d'argent pour trois

(1) *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences.* Séance du 19 janvier 1914.
(2) *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences.* Séance du 20 octobre 1913.

molécules de dioxydiaminoarsénobenzol sera désignée par ACA^3.

Le dioxydiaminoarsenobenzol sera désigné par : *ddab*.

La toxicité de nos trois produits est à peu près la même.

Les lapins de 2 kil. 500 à 3 kilogrammes supportent sans réaction immédiate et sans lésions consécutives apparentes une injection dans la veine de l'oreille de 20 centigrammes dissous dans 20 cent. cubes d'eau.

Les cobayes de 350 à 500 grammes supportent bien une injection de 3 centigrammes dans 3 cent. cubes d'eau, dans les muscles des cuisses.

Les souris de 16 à 22 grammes supportent une injection de 2,5 milligrammes dans 1 cent. cube sous la peau.

Une injection de 11 centigrammes par kilogramme a tué un lapin sur trois.

Une injection de 10 centigrammes par kilogramme a tué deux cobayes sur quatre.

Une injection de 3 milligrammes a tué une souris de 20 grammes sur trois.

On peut donc admettre les données suivantes :

Dose toxique, 10 centigrammes par kilogramme;

Dose tolérée, 7 à 8 centigrammes par kilogramme.

Trypanosomiases.

Pour essayer l'action de mes différents produits et comparer leur action à celle de l'atoxyl et du dioxydiaminoarsénobenzol, je me suis servi principalement de souris infectées de Surra.

Inoculées par piqûres sous la peau, les souris non traitées succombaient généralement quatre à cinq jours après.

Exp. 1. — (*Surra*). Toutes les souris sont injectées une seule fois, le troisième jour après l'infection, quand les trypanosomes sont déjà nombreux.

A. — **Atoxyl.**

doses.	Souris.	résultats.
2/10 mgr.	1	+ 5 jours.
	2	+ —
4/10 mgr.	1	+ —
	2	+ —
5/10 mgr.	1	+ —
1 mgr.	1	R. après 10 j.
	2	R. après 9 —
2 mgr.	1	R. après 11 —
	2	R. après 12 —

B. — ***ddab.***

doses.	Souris.	résultats.
2/100 mgr.	1	+ 4 jours.
3/100 mgr.	1	+ 7 —
4/100 mgr.	1	+ 4 —
—	2	+ 5 —
—	3	+ 6 —
5/100 mgr.	1	+ 5 —
7/100 mgr.	1	+ 5
1/10 mgr.	1	+ 5 —
	2	+ 7 —
	3	R. après 13 j.

C. — **ACA**[4].

doses.	Souris.	résultats.
1/100 mgr.	1	+ 6 jours.
2/100 mgr.	1	+ 6 —
	2	+ 5 —
	3	+ 5 —
	4	+ 6 —
	5	+ 5 —
3/100 mgr.	1	+ 7 —
	2	+ 8 —
4/100 mgr.	1	R. après 8 j.
	2	R. après 7 —
	3	R. après 8 —
	4	R. après 9 —
	5	R. après 13 —
	6	R. après 12 —

C. — **ACA**[4] (*suite*).

doses.	Souris.	résultats.
4/100 mgr.	7	R. après 13 jours.
	8	R. après 22 jours.
	9	. . . . . Guérie.
	10	. . . . . —
	11	. . . . . —
6/100 mgr.	1	R. après 12 jours.
	2	R. après 13 —
	3	R. après 15 —
	4	. . . . . Guérie.
	5	. . . . . —
	6	. . . . . —
7/100 mgr.	1	. . . . . —
	2	. . . . . —
	3	. . . . . —
8/100 mgr.	1	R. après 30 jours.
1/10 mgr.	1	. . . . . —
	2	. . . . . —
	3	. . . . . —

D. — **ABA**[3].

doses.	Souris.	résultats.
4/100 mgr.	1	R. après 13 jours.
	2	R. après 13 —
	3	. . . . . Guérie.
	4	. . . . . —
	5	. . . . . —
	6	. . . . . —
	7	. . . . . —
	8	. . . . . —
	9	. . . . . —
6/100 mgr.	1	R. après 9 jours.
	2	. . . . . Guérie.
	3	. . . . . —
	4	. . . . . —
	5	. . . . . —
	6	. . . . . —

E. — **AIA**[4].

doses.	Souris.	résultats.
4/100 mgr.	1	R. après 6 jours.
	2	R. après 7 —
8/100 mgr.	1	R. après 16 —
	2	R. après 17 —

Le signe + indique la mort de l'animal, la lettre R la récidive.

Il résulte de cette expérience que, pour le Surra, le produit bromé est sensiblement plus actif que les deux autres. On peut évaluer à 7/100 de milligramme la dose qui guérira les souris

par une seule injection sous la peau, faite 60 heures environ après l'inoculation. La dose tolérée étant de 2,5 milligrammes, le rapport entre cette dose et la dose qui guérit serait de 36/1. Ce produit est au moins 3 fois plus actif que le *ddab* et 35 fois plus actif que l'atoxyl. C'est donc surtout avec le produit ABA^3 que j'ai continué les expériences, qui avaient pour but d'établir :

1° *Les effets d'un traitement commencé plus ou moins tard après l'infection*;

2° *Les effets d'un traitement consistant en injections répétées de petites doses qui, injectées une seule fois, n'empêchent pas les récidives*;

3° *Le traitement des récidives.*

Exp. 3. — Deux souris sont injectées le lendemain de l'infection avec 1/100 de milligramme de ABA^3 et ces mêmes doses sont injectées encore deux fois les deux jours suivants. Chez les 2 souris traitées, il n'y avait pas encore de trypanosomes dans le sang au moment de la 1re injection et ces deux souris ne sont jamais devenues malades. Le témoin est mort le cinquième jour.

Exp. 4. — Six souris reçoivent 4 injections de 1/100 de milligramme du même produit pendant quatre jours de suite, mais la première injection a été faite quarante-huit heures après l'infection. Il y avait au moment de la 1re injection des trypanosomes peu nombreux dans le sang. De ces six souris, deux ont des rechutes après treize et vingt-deux jours; les quatre autres sont guéries.

Exp. 5. — Deux souris reçoivent quarante-huit heures après l'infection une 1re injection de 2/100 de milligramme et, de deux jours en deux jours, deux autres injections de 2/100 de milligramme.

Les deux souris n'ont pas de rechutes.

Exp. 6. — Deux souris sont traitées de la même façon, mais ne reçoivent que 2 injections de 2/100 de milligramme. Guérison.

Il semble donc résulter des expériences 3, 4, 5 et 6 :

1° Que l'on peut obtenir des guérisons d'autant plus sûrement et avec des doses d'autant plus faibles que le traitement est commencé plus tôt après l'infection, ce qui confirme les résultats obtenus déjà avec d'autres médicaments;

2° Que des injections à petites doses souvent répétées donnent des résultats meilleurs qu'une injection de la même quantité du médicament en une seule fois.

Exp. 7. — On commence le traitement le quatrième jour après l'infection, au moment où les trypanosomes sont très nombreux dans le sang.

Le traitement et les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau suivant :

JOURS	S. 1	S. 2	S. 3	S. 4	S. 5	S. 6	S. 7
1	0	0	0	0	0	0	0
2	.	.	.	.	.	.	.
3	..	..	..	..	..	..	..
4	...	...	...	...	...	...	...
	1re injection de 5/100 mgr. ABA³.						
5	+	+	....	....	....	....	....
			2e injection de 5/100 mgr.				
6	.....	.....	+	...	...	...	...
				3e injection de 5/100 mgr.			
7	.....	.....	.....	0	0	0	0
8	.....	.....	.....	0	0	0	0
9	.....	.....	.....	0	0	0	0
10	.....	.....	.....	0	0	0	0
11	.....	.....	.....	0	.		
						4e inj. 6/100 mgr.	
12	.....	.....		.	..	.	.
13	.....	.....	.....	..	...	0	0
14	.....	.....	.....	...	...	0	0
						0	0
				4e inj. 6/100 mgr.			
						5e inj. 6/100 mgr.	
15	.....	.....	.....	...	...	.	.
						0	0
						0	0
				5e inj. 6/100 mgr.			
16	.....	.....	.....	...	...	0	0
						0	0
						0	0
				6e inj. 6/100 mgr.			
17	.....	.....	.....	.....	+	0	0
18	.....	.....	.....	+	.....	0	0
19	.....	.....	.....	.....	.....	0	0

Le nombre plus ou moins grand de points (. .. ...) indiquera le nombre plus ou moins grand de trypanosomes dans le sang.

L'expérience 7 montre tout d'abord qu'en commençant le traitement au moment où les trypanosomes sont très nombreux on n'obtient pas de guérison avec des doses cinq à six fois plus fortes que dans l'expérience 3 (1re injection vingt heures après l'infection).

Ce fait donne une indication très importante pour le traitement des rechutes.

Les souris 4 et 5 de l'expérience 7 n'ont pas pu être sauvées malgré trois injections faites *après* la réapparition des trypanosomes dans le sang, tandis que deux injections de la même importance, mais faites *avant* la réapparition des trypanosomes, ont pu empêcher la rechute et guérir les souris définitivement.

On observe donc dans le traitement des rechutes les mêmes faits que dans le traitement des infections primaires, — à cette différence près que, dans les rechutes on a affaire à des parasites déjà plus ou moins immunisés et contre l'action du médicament et contre celle de l'organisme.

On sait en effet que les trypanosomes, ainsi que d'autres microbes (1), peuvent être immunisés contre l'action des antiseptiques et contre celle des sérums microbicides et que dans un organisme infecté et traité par des doses incomplètement stérilisantes, les trypanosomes doivent acquérir cette immunité.

Dans les maladies à rechutes, dans lesquelles on ne peut pas avoir la certitude absolue d'obtenir une guérison définitive par une seule injection, il serait donc tout indiqué de faire plusieurs injections à des intervalles de temps assez rapprochés.

Si en effet, la 1re injection est déjà assez active pour faire disparaître les parasites du sang circulant pendant quelques jours, la 2e injection, faite avant la réapparition des parasites, mettra le malade dans le cas de notre expérience 3; une 3e injection aura encore plus d'effet, et si les quantités de médicament employées ne dépassent pas les doses excitantes, c'est-à-dire curatives pour l'organisme, on mettra ce dernier dans les meilleures conditions de défense.

Il est impossible, en effet, d'assimiler complètement la stérilisation par un antiseptique d'une culture dans un tube à la destruction par ce même antiseptique des microbes dans un organisme malade. Dans ce dernier cas, le problème à résoudre est infiniment plus compliqué.

(1) J. Danysz, Immunisation de la bactéridie charbonneuse contre le sérum de rat et les arsenicaux. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XIV, p. 641.

On sait que les sérums antimicrobiens, par exemple le sérum antipesteux ou antityphique, qui sont très peu ou pas du tout microbicides *in vitro*, peuvent guérir les souris infectées par la peste ou la péritonite typhique des cobayes. Dans ce cas, ainsi que cela a été établi par l'œuvre de Metchnikoff et les travaux de ses nombreux collaborateurs et élèves, la collaboration de l'organisme est évidente et même on peut dire que son rôle dans la destruction des microbes est prépondérant. Le rôle du médicament est indirect, sinon secondaire, parce qu'il rend l'organisme capable de détruire les parasites sans pouvoir les détruire lui-même, — et la quantité du sérum injecté peut (dans certaines limites, bien entendu) dépasser sans inconvénient la dose nécessaire à la guérison, parce que les sérums spécifiques sont, selon l'expression d'Ehrlich, exclusivement parasitotropes.

En ce qui concerne les médicaments chimiques, on n'en connaît pas encore qui auraient cette affinité exclusive pour les parasites. Ces produits ne sont jamais exclusivement spécifiques, ils se fixent sur certains tissus, sur certains organes et produisent, à certaines doses, des troubles plus ou moins apparents et plus ou moins graves. Ils ont, par contre, un avantage que ne possèdent pas les sérums, c'est celui d'augmenter, à certaines autres doses, les moyens de défense de l'organisme en excitant l'activité des phagocytes ou de certaines glandes.

Cette action nocive ou excitante dépend de la dose injectée, de sorte que l'effet d'un antiseptique sur un organisme malade peut être figuré par une courbe présentant un optimum d'action curative qui correspond à une dose déterminée. Au-dessous de cette dose, la dilution de l'antiseptique sera trop grande pour atteindre utilement les microbes; au-dessus, l'antiseptique diminuera les moyens de défense naturels de l'organisme et, dans les deux cas, le résultat sera le même.

Dans ses leçons sur la diphtérie, M. E. Roux nous a fait voir les dangers qui peuvent résulter de l'emploi des antiseptiques trop concentrés ou trop irritants pour la gorge des petits malades. Ces badigeonnages ne pouvaient jamais détruire tous les microbes et ceux qui restaient trouvaient un excellent milieu de culture sur les muqueuses meurtries et mises à vif.

Ces mêmes antiseptiques, employés à doses non irritantes, produisaient des effets bien meilleurs.

C'est dans cet enseignement que j'ai puisé les idées pour l'étude de l'action des antiseptiques et j'ai constaté que les faits signalés par Roux pour les infections localisées se retrouvent aussi dans les septicémies.

Ainsi, quand on infecte des souris par la bouche avec le *bacille typhi murium*, quand on leur injecte le lendemain de l'infection 1/10, 1/2 et 1 milligramme de ABA^3 et quand on fait l'examen bactériologique de leur sang les jours qui suivent, on constate que ce sont les souris qui ont reçu les plus fortes doses qui sont envahies par les microbes le plus tôt et que ce sont elles qui meurent les premières et avant les témoins.

On peut donc affirmer que les antiseptiques ne sont pas capables de détruire à eux seuls tous les microbes d'un organisme malade, que l'intervention de l'organisme est indispensable et que cette intervention sera d'autant plus utile que la quantité du médicament employé sera plus éloignée de la dose toxique.

L'expérience 7 nous donne encore une indication intéressante. On constate que les souris 4 et 5 ont vécu deux fois plus longtemps (six jours), après l'apparition des trypanosomes et malgré la présence de très nombreux trypanosomes dans leur sang, que les souris 1 et 2 (trois jours) ce qui prouverait que si les trypanosomes peuvent s'immuniser contre l'action destructive de l'organisme et des antiseptiques, l'organisme peut à son tour s'habituer aux trypanosomes. Il s'établirait dans ce cas une sorte de symbiose qui pourrait conduire, à la longue, à la création de ces races non pathogènes que l'on rencontre chez beaucoup de mammifères et chez les vertébrés inférieurs ; ces trypanosomes non pathogènes sont généralement beaucoup plus résistants (1) à l'action des antiseptiques probablement parce qu'ils sont naturellement immunisés contre l'action destructive des phagocytes et des humeurs de l'organisme.

L'exemple que je viens de citer n'est peut-être pas assez convaincant parce que, chez les souris, la maladie évolue trop vite, mais j'ai un cobaye qui a été infecté en même temps qu'une série d'autres et qui reçoit tous les quinze ou vingt

(1) Laveran et Mesnil, Trypanosomes et trypanosomiases, p. 302.

jours une petite dose (1 à 4 milligrammes) d'un de mes produits. Ce cobaye, traité ainsi depuis six mois, a toujours des trypanosomes dans le sang et, malgré cela, son poids augmente régulièrement et il semble très bien portant. Les témoins sont morts en quarante-cinq et quatre-vingt-dix jours et, d'après Laveran et Mesnil (1), sur 199 cobayes infestés par le Tr. du surra, la survie la plus longue était de cent quatre jours.

Les trypanosomes Rhodesiense, Gambiense et Dimorphon.

Quelques expériences comparatives m'ont permis de constater que le produit ABA^3 est à peu près aussi actif pour le trypanosome *Rhodesiense* (du laboratoire de Laveran) et le trypanosome *Gambiense* (du laboratoire de Mesnil) que pour le Surra (du laboratoire de Mesnil).

J'ai pu guérir des souris infectées avec le trypanosome *Rhodesiense* par une seule injection de 1/10 de milligramme de ABA^3 seul et de 4/100 de milligramme quand on combine le ABA^3 avec du trypanorouge.

Par contre, des doses de 1 et même de 2 milligrammes de ABA^3 ne font que retarder de quelques jours la mort des souris infectées par le Tr. Dimorphon.

J'ai réussi pourtant à guérir quelques souris infectées avec le Tr. Dimorphon par un mélange de 3 milligrammes ACA^5 et avec 2 milligrammes de ABA additionné de 1 milligramme de Trypanorouge et une autre par un mélange de 1 milligramme de ABA^3 et de 1 milligramme de Tryparosan.

Spirilloses.

Dans la spirillose des poules (du laboratoire de Marchoux), le produit ACA^4 s'est montré beaucoup plus actif que le 606.

Exp. 8. — Trois poules sont injectées le lendemain de l'infection dans le muscle pectoral. Au moment de l'injection les spirilles sont nombreux.

1re injection.	Poule n° 1, 3 mgr. *ddab*. Poule n° 2, 3 mgr. ACA^3. Poule n° 3, 3 mgr. 71 (2).	le lendemain les spirilles sont encore nombreux.

(1) *Trypanosomes et trypanosomiases*, p. 364.

(2) Composé de dioxydiaminoarsénobenzol et de cyanure d'or et de potassium.

2e injection.	Poule n° 1, 5 mgr. *ddab*. Poule n° 2, 3 mgr. ACA^3. Poule n° 3, » mgr. 71 . .	Le lendemain + Disparition des spirilles et guérison.

Cette expérience a été répétée avec cette différence que les 3 poules avaient été injectées une seule fois avec 5 milligrammes des mêmes produits.

Le résultat avait été le même que dans le cas précédent.

Chancre syphilitique des lapins.

Deux lapins (du laboratoire de M. Levaditi) présentant des chancres syphilitiques au même degré de développement et riches en spirochètes ont reçu :

Le premier (poids 2 kilogr. 700) : 15 centigrammes d'un composé de *ddab* et d'éosinate d'argent. Les trypanosomes ont disparu en vingt-quatre heures :

Le deuxième (poids : 2 kilogr. 800), 15 centigrammes de dioxydiaminoarsénobenzol seul. Après vingt-quatre heures, il y avait encore quelques tréponèmes vivants; après quarante-huit heures, il n'y en avait plus.

Les deux lapins ont guéri à peu près en même temps.

J'ai reconnu plus tard que le composé à l'éosinate d'argent était moins actif que le composé bromé. Ce dernier composé essayé à la dose de 10 milligrammes sur un lapin de 2 kilogr. 500 infecté par M. Lancereaux au laboratoire de M. Louis Fournier et présentant un beau chancre du scrotum très riche en spirochètes, a fait disparaître ces derniers en quinze heures. Le chancre a été guéri en douze jours.

Syphilis de l'homme.

M. Fournier a donc voulu essayer ce produit (ABA^3) dans la syphilis de l'homme, et voici quelques résultats de ces traitements tels qu'ils m'ont été communiqués par M. Lesage, interne du service :

Malade 2245. — Syphilis d'un an. Plaques muqueuses hypertrophiques suintantes de l'anus. Wassermann positif.

A reçu, du 11 au 18 décembre, 4 injections de 15, 20, 15, 25 centigrammes En tout : 75 centigrammes.

Le 18 décembre, plaques muqueuses aplaties, mais encore légèrement suintantes.

Le 20 décembre. Wassermann positif.

Malade 2249. — Chancre phagédénique datant de trois semaines. Wassermann positif.

Injections du 11 au 18 décembre, 15, 20, 15, 25 centigrammes. En tout : 75 centigrammes de ABA.

Le 20 décembre, chancre presque cicatrisé, avec encore une petite ulcération dans le fond.

Le 28 décembre, chancre complètement cicatrisé.

Le 13 janvier, pas d'accidents secondaires. Wassermann positif.

Malade 2283. — Chancre diphtéroïde du méat datant de quatre semaines, grosse induration, adénite bi-inguinale marquée. Wassermann positif.

A reçu, du 25 décembre au 5 janvier, 20, 20, 15, 20 centigrammes. En tout : 75 centigrammes de ABA.

Le 3 janvier, chancre presque guéri.

Le 8 janvier, complètement guéri, adénite bien diminuée.

Le 26 janvier, pas d'accidents secondaires. Wassermann *négatif.*

Malade 2285. — Chancre de la face interne du prépuce datant de quinze jours. Wassermann positif.

A reçu, du 25 décembre au 3 janvier, 20, 15, 20 centigrammes. En tout : 55 centigrammes de ABA.

Le 3 janvier, chancre complètement cicatrisé.

Le 18 janvier. Wassermann positif.

Malade 2289. — Syphilis de quatre mois. Plaques muqueuses du scrotum et de l'anus. Roséole érythémateuse du tronc. Angine. Plaques hypertrophiques de la langue.

A reçu, du 27 décembre au 3 janvier, 20, 15, 20 centigrammes. En tout : 55 centigrammes de ABA.

Le 3 janvier, amélioration très nette de toutes les lésions.

Le 10 janvier, le malade va très bien, toutes les lésions ont disparu.

Malade 1882. — 1er août 1913. Chancre syphilitique du prépuce cicatrisé depuis trois mois, adénite, roséole, plaques muqueuses. Wassermann positif.

Reçoit du 4 au 13 août trois injections de 50 centigrammes de 606.

Le 14 août. Amélioration sensible.

Le 15 septembre, à la place du chancre, il y a une ulcération chancriforme et ulcération au niveau du méat.

Le 25 septembre, les bords du chancre sont plus nets qu'au début. Injection de 50 centigrammes de 606. Wassermann légèrement atténué.

Le 24 octobre, le chancre n'est pas guéri. Wassermann positif.

Le 5 novembre, chancre incomplètement cicatrisé. Injection de 50 centigrammes de 606.

Le 4 janvier 1914, l'ulcération du limbe persiste, ne s'est jamais cicatrisé omplètement. Wassermann positif.

Le 8 janvier, en plus de l'ulcération du limbe, il existe trois autres ulcérations ressemblant tout à fait à des accidents primitifs. Syphilis chancriforme.

Le 10 janvier, injection de 18 centigrammes de produit bromo-arséno-argentique (ABA^3).

Le 13 janvier, amélioration très nette de toutes les lésions.

Du 13 au 20 janvier, trois injections de 0,20 centigramme de ABA^3.

Le 20 janvier, toutes les lésions sont cicatrisées.

On a traité de cette façon jusqu'à présent (1er mars 1914) 80 cas, et dans tous ces cas on a constaté des résultats analogues. Le cas 1882 est plus particulièrement intéressant, parce que ses lésions ont résisté à un traitement prolongé par l'arsénobenzol, et ont été sensiblement améliorées dès la première injection de 0,18 centigramme du produit ABA^3.

Ainsi, avec des doses de 0,55 à 0,75 centigramme de ABA^3 en 3 ou 4 injections répétées tous les deux ou trois jours, on obtient des résultats au moins aussi bons et souvent meilleurs et plus rapides qu'avec 1 gr. 50 à 2 grammes de 606.

Les injections de ce produit sont généralement très bien tolérées. Elle ne sont suivies ni de vomissements, ni même de nausées.

Quelquefois la première injection est suivie dans les douze à vingt-quatre heures d'une légère élévation de température, qui ne se manifeste plus aux injections suivantes. Ce serait donc une réaction spécifique, c'est-à-dire une conséquence naturelle de l'action du produit sur les spirochètes.

En résumé, on peut donc affirmer que l'addition de l'argent au dioxydiaminoarsénobenzol, surtout sous la forme de bromure et d'iodure d'argent, ce qui permet de fixer également le brome et l'iode, augmente considérablement les propriétés antiseptiques et curatives de chacune de ces substances prises séparément, sans en augmenter les propriétés toxiques.

Les essais de traitement de certaines septicémies me donnent à penser que les produits chimiques curatifs n'agissent pas exclusivement comme antiseptiques dans les organismes infectés; que, dans ce cas, comme dans le cas des sérums antimicrobiens, l'intervention de l'organisme, et en particulier des phagocytes, joue le rôle le plus important dans la destruction des microbes.

INFLUENCE
DES DIFFÉRENTES ESPÈCES DE SACCHAROMYCES
SUR MILIEUX ARTIFICIELS ET NATURELS

par Jules VENTRE.

(DEUXIÈME PARTIE)

Examen des résultats analytiques.

Les essais dont il vient d'être question ont été contrôlés deux fois et les résultats inscrits dans les tableaux représentent la moyenne des deux dosages.

Les méthodes d'analyse auxquelles j'ai eu recours sont les méthodes officielles, c'est-à-dire : *pour l'alcool*, la détermination après distillation d'une quantité de liquide égale à environ 200 centimètres cubes et emploi de l'alcoomètre légal. De cette manière, je pouvais être sûr du dixième de degré.

Pour *l'acidité totale*, j'ai adopté, après contrôle, la *méthode volumétrique gazeuse* (1) ; cette méthode me permettait de me rendre compte en même temps de la quantité de gaz carbonique que pouvaient tenir en dissolution les vins.

Pour *l'acidité volatile*, j'ai employé uniquement la *méthode de Duclaux* en ayant soin de conduire la distillation d'une manière régulière et en évitant, autant que possible, les coups de feu.

La détermination de *l'extrait sec* a eu lieu par la méthode à 100 degrés et par la méthode du vide. De manière à éviter toutes causes d'erreur, j'ai, dans le cas de la *méthode à* 100 *de-*

(1) Cette méthode qui, à l'heure actuelle, est employée d'une manière presque exclusive au laboratoire de technologie à l'École d'Agriculture de Montpellier, est basée sur les différences proportionnelles des volumes de gaz carbonique dégagé par deux acidités dont l'une est connue, agissant sur un excès de bicarbonate alcalin. L'opération consiste donc à faire d'abord

grés, opéré par série et en intervertissant, au cours de l'évaporation, l'ordre des capsules ; j'avais ainsi la certitude que les mêmes causes agissaient uniformément sur toutes les capsules.

La *quantité de cendres totales* a été obtenue à la suite de deux opérations successives, c'est-à-dire que la matière organique de 50 centimètres cubes de vin, sitôt carbonisée au

un tarage pour lequel on emploie la solution décinormale d'acide sulfurique, puis à répéter ensuite la même opération avec le liquide dont on doit déterminer l'acidité. La différence entre les deux volumes est multipliée par un coefficient, ordinairement constant pour les acidités que l'on a le plus souvent à mesurer, et le produit est ajouté ou retranché du chiffre d'acidité connue, selon que l'acidité inconnue est supérieure ou inférieure à celle du liquide de tarage. L'appareil dont on se sert est un tube de Scheibler pour le dosage de l'acide carbonique dans les calcaires, simplifié, que Bernard avait appliqué au dosage calcimétrique des terres et étendu à l'acidimétrie des vins (fig.). Pratiquement, on fait réagir 20 cent. cubes de liqueur acide sur 5 cent. cubes de bicarbonate de sodium à 7 p. 100 ou de potassium à 8,5 p. 100. Les résultats concordent parfaitement avec ceux obtenus par le dosage alcalimétrique. Le coefficient est sensiblement constant pour des acidités comprises entre 5 et 10 grammes d'acide sulfurique par litre et correspond à 0,115. Dans les conditions les plus générales de la pratique (15-20 degrés centigrades), on n'a pas à faire de corrections de température.

Exemple : Soit V le nombre de cent. cubes de gaz carbonique obtenu avec la liqueur sulfurique décinormale (titre = 4gr9 par litre) : soit V′ le nombre de cent. cubes obtenu avec le liquide à acidité inconnue : on aura comme résultat :

Si $V > V'$ $\quad A = 4.9 \pm (V - V')\ 0{,}115$

Si $V' > V$ $\quad A = 4.9 - (V - V')\ 0.115$

$A = 4.9 + (V' - V)\ 0.115$

rouge sombre, était lavée grossièrement de manière à séparer les sels susceptibles de se décomposer ou de se volatiliser (phosphates, chlorures, etc.); ce lavage effectué, le charbon restant sur le filtre était brûlé complètement. Les cendres ordinairement blanches obtenues, étaient traitées par du carbonate d'ammonium afin de ramener à l'état de carbonate les sels de calcium décomposés par la chaleur.

La *crème de tartre* et *l'acide tartrique* total, ont été déterminés par la *méthode de Berthelot* et de *de Fleurieu*, qui est d'ailleurs la méthode officielle. De manière à avoir encore dans ce dosage le maximum de garantie, j'ai établi, pour chaque série, le coefficient de correction. Ce coefficient, qui est fixé ordinairement à 0,2, est variable et doit être établi à chaque essai. A cet effet, je traitai 20 centimètres cubes de liquide contenant une quantité déterminée de crème de tartre proche de la saturation, par 80 centimètres cubes d'un mélange éthéro-alcoolique à parties égales. Par différence entre l'acidité primitivement dosée du milieu et l'acidité de la crème de tartre précipitée, je déterminai la valeur du coefficient à appliquer.

Les méthodes employées étaient susceptibles de donner des résultats sensibles et parfaitement comparables entre eux; j'ai tout lieu d'admettre que les chiffres analytiques obtenus pourront permettre de tirer des conclusions et donneront le moyen de différencier les diverses levures entre elles, sans que, pour cela, on puisse attribuer à un manque de sensibilité des méthodes les différences enregistrées. Ceci étant posé, je vais examiner chacun des éléments dosés et essayer d'en dégager des conclusions intéressantes au point de vue de la classification des levures par leurs propriétés biochimiques.

Alcool. — Au point de vue général, on observe tout d'abord que, quel que soit le milieu, naturel ou artificiel, sur lequel les ferments opèrent, la levure de Médoc donne toujours des proportions d'alcool inférieures à celles produites par les autres. Si on traduit par des chiffres la valeur alcooligène de chaque levure, on verra qu'alors il faut de 17 à 17,1 grammes de sucre au Beaujolais, Romanée, Verzenay, pour faire un degré d'alcool; la levure de Médoc en exige de 17,6 à 17,85 grammes. On peut dire que ces différences ne sont pas dues à une incomplète uti-

lisation du sucre contenu dans les différents milieux puisque, ainsi qu'on a pu s'en rendre compte par ce qui a été déjà dit, il n'existe pas dans les produits fermentés de matière réductrice résiduelle. Par conséquent, on peut admettre que les différences observées dans les quantités d'alcool produites traduisent une activité biologique spéciale et absolument propre à une levure déterminée.

Comme toutes les fermentations ont eu lieu en milieux stérilisés et que des lies examinées au microscope n'ont pas décelé de contamination, on a, de ce fait, une autre preuve que la faiblesse alcoolique propre au Médoc est bien le résultat d'un processus biologique spécial.

On en trouvera enfin une dernière preuve dans le fait que la diminution du titre alcoolique conserve absolument sa valeur dans les essais sulfités. Or, il est aujourd'hui classique, que, dans un milieu naturel non aseptisé, l'addition d'acide sulfureux assure une meilleure utilisation du sucre, et partant un rendement alcoolique plus élevé.

On remarque également un fait intéressant, et déjà observé en pratique courante, que la levure de Beaujolais et celle de Verzenay paraissent être les plus susceptibles de donner le maximum d'alcool, en même temps qu'elles paraissent imprimer au milieu dans lequel elles se développent un cachet spécial qui se retrouvera toujours à la dégustation.

Acidité totale. — L'acidité totale en elle-même n'est pas très intéressante car, à part les produits obtenus avec l'ensemencement Beaujolais, qui sont généralement moins riches en acide, tous les autres essais donnent des résultats sensiblement identiques. Mais on trouvera des différences notables en ce qui concerne la manière dont se comportent les diverses levures vis-à-vis de l'acidité fixe et leur manière d'être au point de vue de leur production d'acidité volatile.

Acidité volatile. — Cet élément, dont le dosage a été fait très soigneusement, donnera des indications intéressantes sur la vie de la levure. Si on considère le chiffre moyen des dosages effectués dans les vins blancs et les vins rouges, on arrive aux résultats suivants :

MILLIGRAMMES D'ACIDITÉ VOLATILE PAR LITRE EN ACIDE SULFURIQUE

	TÉMOIN	BEAUJOLAIS	MÉDOC	ROMANÉE	VERZENAY
	—	—	—	—	—
Blancs.	442	399	347	402	393
Rouges	298	298	373	344	327

On a vu, lors de l'étude des milieux de culture, que la quantité d'acide volatil trouvée était du même ordre et paraissait tenir à la levure employée. Les différences peuvent, au premier abord, sembler relativement faibles et tenir aux erreurs de méthode, mais, si on considère que le titre de la liqueur de chaux adoptée est de 0,0022 gramme d'acide sulfurique par centimètre cube de liqueur, on se rend compte que les différences entre les chiffres les plus forts et les plus faibles correspondent à 3 cent. cubes et à 6 cent. cubes de la solution alcaline. On ne peut donc imputer à des erreurs de lecture les résultats dissemblables trouvés.

D'autre part, on voit que les échantillons examinés sont en parfait état de conservation, et leur teneur en acides volatils n'a rien de pathologique.

Voilà donc déjà un caractère biochimique permettant de différencier les diverses levures entre elles.

Acidité fixe. — La détermination de l'acidité fixe donnera également des indications intéressantes sur la manière dont les différents ferments se comportent vis-à-vis des principaux acides entrant dans la constitution du vin. J'ai donc dosé simultanément l'acide tartrique total, la crème de tartre et l'acide tartrique libre, ainsi que l'acide succinique. Pour la recherche de ce dernier acide, j'ai employé la méthode de détermination des acides solubles dans l'éther, mais en m'entourant de certaines précautions que la pratique m'a révélées comme indispensables à l'obtention de résultats constants.

J'opérais sur l'extrait desséché dans le vide en présence de petites quantités de quartz grossièrement pulvérisé, afin d'obtenir une division aussi parfaite que possible de la masse. A l'aide d'un agitateur, le tout était mis dans un flacon d'environ 100 cent. cubes. On ajoutait alors 25 cent. cubes d'éther distillé sur le sodium, à 66°. On agitait à plusieurs reprises pen-

dant environ 10 minutes ; on décantait l'éther sans entraîner de matière et on le remplaçait par une quantité égale de liquide nouveau. Après une nouvelle agitation n'excédant pas 5 minutes, on décantait et on réunissait cette deuxième portion de liquide à la première. J'ai pu me rendre compte qu'à la suite de ce deuxième lavage, il était parfaitement inutile d'en faire un troisième.

Les liquides acides réunis étaient évaporés à feux doux

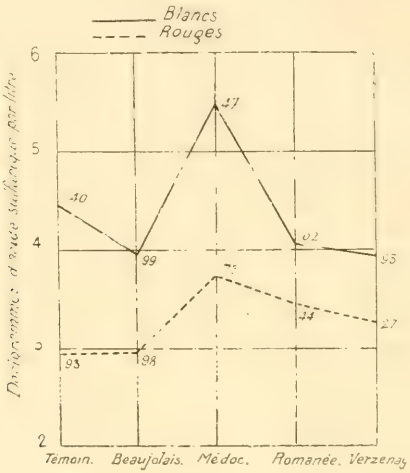


Fig. 1. — Variation de l'acidité volatile (en décigrammes et *milligrammes*).

et en présence d'une petite quantité d'eau ; quand tout l'éther avait distillé, on procédait au dosage en se servant comme base d'une liqueur alcaline de soude, sensiblement vingtième normale.

Comme, indépendamment des acides tartrique et succinique, il en existe d'autres et parmi eux l'acide malique, difficilement dosable, j'ai déterminé ces acides par différences en faisant le bilan de l'acidité fixe.

Comme l'acidité ne change pas dans le milieu, quand on dose soit l'acidité fixe, soit l'acidité correspondante à la crème de tartre et l'acidité qui reste dans le milieu après précipitation, j'ai fait le bilan en me servant des résultats trouvés pour l'acide tartrique total et le tartre. Comme, d'autre part, la teneur en

matière alcaline des vins de 1912 était très faible, cette dernière correspondant sensiblement à la crème de tartre précipitée. j'ai tout lieu de penser que les acides qui se trouvent dans le milieu après précipitation sont à l'état libre. Voici les résultats trouvés par ce moyen et en exprimant tous les acides non déterminés en acide malique.

BILAN DE L'ACIDITÉ DES VINS DE 1912, EN ACIDE SULFURIQUE

	DÉSIGNATION des échantillons.	ACIDITÉ fixe.	ACIDITÉ de l'acide tartrique libre.	ACIDITÉ de l'acide tartrique combiné.	ACIDITÉ de l'acide citrique.	ACIDITÉ de l'acide succinique.	ACIDITÉ due aux ac. autres en acide malique.
	BLANCS :	gr.	gr	gr.	gr.	gr.	gr.
Filtrés	Témoin. . .	4,217	0,470	0,830	»	1,270	1,647
	Beaujolais .	4,223	0,500	0,740	»	1,162	1,821
	Médoc . . .	4,285	0,470	0,730	»	1,500	1,585
	Romanée. .	4,435	0,470	0,830	»	1,300	1,835
	Verzenay. .	4,153	0,470	0,800	»	1,120	1,763
Chauffés	Témoin. . .	4,333	0,400	0,853	»	1,290	1,890
	Beaujolais .	4,449	0,400	0,975	»	1,330	1,744
	Médoc . . .	4,862	0,370	1,053	»	1,450	1,989
	Romanée. .	4,666	0,375	1,010	»	1,290	1,991
	Verzenay. .	4,774	0,443	1,019	»	1,080	2,232
Sulfités	Témoin. . .	4,662	0,323	0,904	0,105	1,370	1,920
	Beaujolais .	4,581	0,302	0,857	0,105	1,370	1,957
	Médoc . . .	4,661	0,349	0,811	0,105	1,370	2,027
	Romanée . .	4,584	0,302	0,834	0,105	1,300	2,043
	Verzenay. .	4,673	0,302	0,857	0,105	1,270	2,049
Filtrés	Témoin. . .	7,667	0,702	1,184	0,070	1,080	4,631
	Beaujolais .	6,802	0,557	1,173	0,070	1,120	3,882
	Médoc. . .	7,601	0,431	1,108	0,105	1,245	4,712
	Romanée. .	7,571	0,549	1,184	0,070	1,040	4,773
	Verzenay. .	7,442	0,396	1,102	0,070	0,897	4,977
Chauffés	Témoin. . .	7,480	0,480	1,238	»	0,913	4,848
	Beaujolais .	7,401	0,396	1,152	»	1,080	4,473
	Médoc . . .	7,503	0,307	1,058	»	1,200	4,938
	Romanée. .	7,353	0,162	1,152	»	1,120	4,919
	Verzenay. .	7,240	0,328	1,058	»	0,913	4,951
Sulfités	Témoin. . .	7,810	0,323	1,034	0,350	0,996	5,107
	Beaujolais .	7,651	0,286	1,069	0,140	1,100	5,056
	Médoc . . .	7,766	0,234	1,034	0,280	1,120	5,098
	Romanée. .	7,493	0,245	1,069	0,210	0,996	4,993
	Verzenay. .	7,685	0,234	1,034	0,140	0,996	5,281

Le bilan étant fait, si on prend la moyenne des valeurs acides différentes de chaque essai ensemencé avec un ferment diffé-

rent, on s'aperçoit qu'entre tous c'est l'acidité malique qui est la plus caractéristique. Voyons comment ces acides varient d'une levure à l'autre.

VARIATIONS DE L'ACIDE TARTRIQUE

Acidité tartrique totale en tartre. (Moyenne par litre.)

	TÉMOIN	BEAUJOLAIS	MÉDOC	ROMANÉE	VERZENAY
	—	—	—	—	—
	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.
Blancs	4,04	4,02	4,08	4,13	4,19
Rouges	5,05	5,10	4,76	4,56	4,70

L'acidité tartrique totale, tout au moins pour les essais en *blancs*, ne paraît pas être influencée par l'espèce de germe qui a transformé le milieu. Pour ce qui est des essais rouges, soit que la quantité initiale de l'élément tartrique ait été plus importante que dans les blancs, soit que l'action des ferments ait été plus brutale, on relève des différences appréciables, variant entre 400 et 600 milligrammes. Ceci n'aurait pas une importance très grande, si on n'admettait, en principe, que l'acide tartrique n'est ordinairement pas attaqué par les saccharomyces. Comme aucun phénomène chimique n'a pu agir, on peut donc dire que, dans une certaine mesure, les levures sont susceptibles de détruire de l'acide tartrique. Si on examine les quantités moyennes d'acide tartrique libre, existant dans chaque essai, on voit que cet élément est encore plus variable.

ACIDITÉ TARTRIQUE LIBRE EN TARTRE

	TÉMOIN	BEAUJOLAIS	MÉDOC	ROMANÉE	VERZENAY
	—	—	—	—	—
Blancs	0,763	0,768	0,763	0,733	0,773
Rouges. . . .	1,630	1,480	1,320	1,280	1,250

D'après ces données, ce serait surtout l'acide tartrique qui serait touché. Quoi qu'il en soit, *il paraît indéniable que cet acide peut entrer dans la catégorie des hydrocarbones attaqués par les levures.*

Variations de l'acidité malique.

En se rapportant aux chiffres du bilan, on peut suivre la marche des acides autres que les acides tartrique et succinique. Comme la quantité d'acide malique est de beaucoup la plus importante, je ne crois pas faire de grosses erreurs en les exprimant tous en acide malique. Dans le tableau suivant, les résultats sont exprimés en grammes d'acide malique (fig. 2).

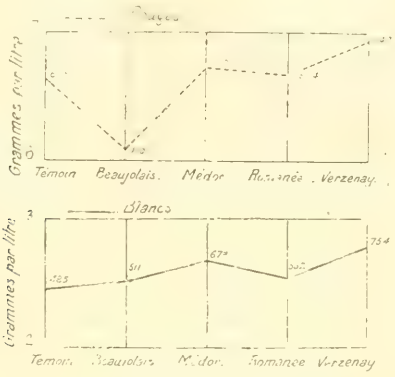


Fig. 2. — Variation de l'acidité malique (en grammes et *milligrammes*).

	TÉMOIN	BEAUJOLAIS	MÉDOC	ROMANÉE	VERZENAY
	—	—	—	—	—
Blancs	2,486	2,511	2,673	2,552	2,754
Rouges	6,646	6,110	6,720	6,684	6,947

Si on transforme la valeur de ces chiffres en acide sulfurique, en les multipliant par le coefficient 0,731, on s'aperçoit que les différences observées entre les produits des diverses levures sont assez importantes. Au point de vue numérique, elles varient pour les blancs entre 2,486 et 2,754 et pour les rouges entre 6,110 et 6,947. Au point de vue organoleptique, on perçoit ces différences, et les vins, soit blancs, soit rouges, paraissent au palais d'autant plus acides qu'ils contiennent plus de ces acides non déterminés. Les vins levurés Médoc et Verzenay, qui en contiennent le plus, sont effectivement les plus acides au goût.

On peut également se rendre compte de l'influence de l'acide sulfureux sur la conservation de ces acides spéciaux; mon collègue E. Dupont et moi avions signalé, dès 1904-1905, l'augmentation de l'acidité dans les vins sulfités. Cette augmentation n'étant pas corroborée par la présence dans le milieu d'une quantité plus grande d'acide tartrique, nous avions pensé qu'elle pouvait provenir de la conservation de l'acide malique; cette hypothèse fut d'ailleurs vérifiée quelque temps après par M. Mestrezat. La variation de ces acides reste toujours la même selon les levures employées, mais du témoin au sulfité, elle est énorme. Le tableau suivant fera voir, mieux que tout commentaire, l'importance de ces variations. Les résultats y sont exprimés en grammes d'acide sulfurique.

INFLUENCE DE L'ACIDE SULFUREUX SUR LA CONSERVATION DES ACIDES AUTRES QUE L'ACIDE TARTRIQUE

	TÉMOIN	BEAUJOLAIS	MÉDOC	ROMANÉE	VERZENAY
	—	—	—	—	—
Blancs filtrés . .	1,647	1,821	1,585	1,835	1,763
Blancs sulfités .	1,920	1,947	2,027	2,043	2,049
Rouges filtrés .	4,631	3,882	4,712	4,773	4,977
Rouges sulfités.	5,107	5,056	5,098	4,993	5,281

On a ainsi une confirmation de notre hypothèse première et des résultats de M. Mestrezat. Je profiterai de l'occasion qui se présente à moi pour dire que, quelle que soit la forme sous laquelle on emploie l'acide sulfureux (métasulfite, anhydride sulfureux liquide, etc.), le sulfitage se traduira toujours par une augmentation de l'acidité totale. On réduit ainsi à néant les assertions de ceux qui prétendent, d'une manière intéressée, que le métasulfite de potasse n'est pas à recommander, car, renfermant de la potasse, il est susceptible de neutraliser une partie des acides. Cela peut être vrai, relativement, mais la conservation des acides ordinairement détruits compense et au delà la petite quantité d'acide tartrique précipité, sous forme de tartre. De l'ensemble de ces résultats, on peut tirer la conclusion *qu'entre toutes les levures il en est qui ont une préférence plus marquée que d'autres pour les acides autres que l'acide tartrique et notamment pour l'acide malique.*

Variations de l'acide citrique.

Bien qu'il soit assez difficile de se faire une idée nette de la manière dont se comportent les levures vis-à-vis de l'acide citrique, on pourra tirer d'utiles renseignements de l'examen des échantillons sulfités. Ainsi qu'il résulte des recherches nombreuses faites par mon ami et collègue Dupont, cet acide existe toujours en assez grande quantité dans le moût de raisin, mais est ordinairement détruit avec la plus grande facilité au cours de la fermentation. Seuls, les essais sulfités conservent presque intégralement leur acide citrique. J'ai demandé à M. Dupont de bien vouloir rechercher cet acide dans mes essais de 1912 ; on a vu dans l'établissement du bilan en quelle proportion il se trouvait dans les différents milieux.

Il ressort nettement de ces dosages que la levure de Médoc paraît être celle qui consomme le moins de cet acide ; effectivement, si on examine les chiffres donnés pour les essais rouges filtrés et sulfités, on s'aperçoit qu'entre le Médoc et le Verzenay, par exemple, les proportions varient du simple au double. L'acide sulfureux conservant ordinairement l'acide citrique, on peut donc dire que *les différences observées tiennent bien à la façon d'être des ferments vis-à-vis de cet élément.*

Variations de l'acide succinique.

Cet acide varie avec les levures employées, et cette variation est d'autant plus intéressante qu'il ne préexiste pas dans le milieu et est un produit de l'activité biologique du ferment. Les travaux de Pasteur nous ont appris, en effet, que chaque fois qu'il se produit une fermentation alcoolique dans un milieu sucré, il y a formation d'acide succinique. D'après Rau, il paraît exister une relation directe entre la production d'alcool et celle de l'acide succinique. On verra plus loin que dans mes essais cette assertion ne se vérifie pas avec toutes les levures.

Si on prend la moyenne des résultats obtenus analytiquement, on peut établir le tableau suivant :

	TÉMOIN	BEAUJOLAIS	MÉDOC	ROMANÉE	VERZENAY
	—	—	—	—	—
Blancs	1,577	1,549	1,733	1,561	1,393
Rouges. . . .	1,200	1,324	1,430	1,266	1,425

Ces chiffres représentent l'acidité en acide succinique; pour avoir la teneur en acide sulfurique, on les multipliera par 0,830. Le rapport existant entre les poids d'alcool et ceux d'acide succinique varie entre 1,42 p. 100 et 1,85 p. 100. En un mot, *le rapport n'est pas constant et varie avec la levure utilisée.*

Variation de l'extrait sec.

Au cours des analyses, j'ai été surpris de constater que toutes les levures ne se comportaient pas vis-à-vis des matières extractives de la même manière, et qu'on pouvait relever pour certains ferments une espèce d'*atténuation* comparable à celle que l'on observe dans la brasserie.

On désigne, en brasserie, sous le nom d'atténuation, la proportion centésimale d'extrait qu'une levure peut faire fermenter. Le degré d'atténuation est variable avec les espèces de levures. On sait, en effet, que les levures *Saaz* donnent une atténuation faible, car elles ne touchent guère aux dextrines. Les levures de *Frohberg*, au contraire, donnent une atténuation élevée, car elles font fermenter une partie des dextrines plus ou moins attaquables. La levure *Logos* aurait même, d'après Van Laer et Denamur, la propriété de pousser plus loin l'atténuation, en détruisant les dextrines inattaquées par *Frohberg*. Ces différences entre les levures seraient dues à une sécrétion plus ou moins abondante de diastases saccharifiantes susceptibles de transformer la dextrine en maltose.

L'atténuation dans les vins est surtout donnée au maximum par les levures de Verzenay et de Beaujolais. L'atténuation paraît, au contraire, être nulle pour le Médoc. Voici la moyenne des chiffres en grammes de l'extrait à 100 degrés pour chaque levure :

	TÉMOIN	BEAUJOLAIS	MÉDOC	ROMANÉE	VERZENAY
	—	—	—	—	—
Blancs	16,56	16,14	17,00	16,92	15,18
Rouges. . . .	20,52	19,15	20,27	20,05	18,52

Comme on le voit, cette atténuation est relativement considérable en ce qui concerne les produits ensemencés avec le Verzenay, puisque les différences enregistrées entre le témoin et lui sont d'environ 1 gr. 4 pour les vins blancs et de 1 gr. 75

pour les rouges. De manière à me rendre compte si ces différences étaient dues véritablement à l'action de la levure ou à des erreurs provenant de la méthode de dosage à 100 degrés, j'ai recommencé les déterminations en me servant du vide. Voici les résultats que j'ai obtenus (fig. 3) :

	TÉMOIN	BEAUJOLAIS	MÉDOC	ROMANÉE	VERZENAY
	—	—	—	—	—
Blancs	17,76	17,55	19,22	18,03	17,32
Rouges	21,76	20,78	22,37	21,28	20,88

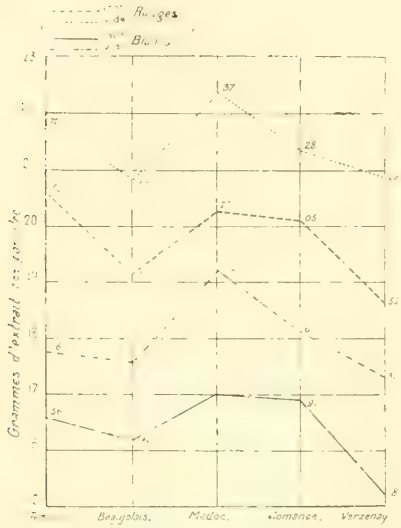


Fig. 3. — Variation des extraits secs à 100 degrés et dans le vide (en grammes et *centigrammes*).

On voit qu'ici encore l'atténuation reste évidente. Cependant les moyennes que je donne sont au-dessous de la réalité, car, dans leur établissement, rentrent les résultats se rapportant aux essais sulfités. Dans ces derniers, en effet, l'action atténuante des levures paraît être annihilée, ou du moins paraît être la même pour toutes, sauf cependant pour le Médoc, où le poids de l'extrait reste supérieur à celui des autres essais.

A propos de l'acide sulfureux, on peut faire ici encore une observation identique à celle qu'on a enregistrée quand on a étudié les variations de l'acide malique. Les gains en extrait sec des essais sulfités sont trop importants pour qu'on n'établisse

pas un parallèle entre les vins témoins et ceux ayant reçu de l'antiseptique.

	TÉMOIN	BEAUJOLAIS	MÉDOC	ROMANÈE	VERZENAY
	—	—	—	—	—
Blancs filtrés . .	17,40	16,95	18,45	17,70	16,40
Blancs sulfités .	17,90	17,85	19,25	18,00	17,95
Rouges filtrés .	21,50	20,20	22,35	21,20	20,60
Rouges sulfités.	22,10	20,60	22,45	21,59	21,50

De même que l'on sait à quoi est due l'atténuation donnée par les levures en brasserie, de même j'ai cherché à savoir sur quel élément portait l'action des ferments en le détruisant ou en le conservant. Pour cela, je me suis livré à la recherche des constituants de la manière extractive. Le bilan de l'acidité me donne déjà les matières acides; indépendamment de ces corps, j'ai dosé les matières minérales et le tanin; enfin, la glycérine.

Le dosage de la *glycérine* donnera des indications intéressantes, car c'est encore un des produits de l'activité biologique. Cet élément varie, en effet, selon les levures; Effront, Laborde ont vu que la glycérine se produisait surtout dans les dernières périodes de la fermentation. On a vu également qu'elle variait avec la nature du milieu et la race de levure, ainsi qu'avec la présence, sur le raisin, d'une quantité importante de *botrytis cinereä*.

Les poids de glycérine que j'ai déterminés font bien voir l'influence de la race de levure; cependant les variations n'atteignent pas des proportions énormes et telles que certains auteurs en ont signalé.

La question du dosage est très délicate, car quelle que soit la méthode suivie, on est obligé de s'entourer de précautions permettant de se préserver de certaines contingences qui pourraient fausser les résultats. J'ai essayé la plupart des méthodes recommandées en ces dix dernières années; malheureusement, soit manque d'habileté de ma part, soit difficultés matérielles rencontrées dans leur application, je n'ai jamais pu obtenir des résultats constants. J'en suis donc revenu tout simplement à la méthode de Pasteur, mais en opérant sur 100 cent. cubes de produit complètement fermenté.

Le volume de liquide était évaporé dans une capsule de por-

celaine dans une étuve à air chaud et de manière que la température ne dépasse jamais 50 degrés; comme à cette température l'évaporation est très longue et que le liquide est susceptible de fleurir ou de moisir, il faut avoir soin de mettre dans la capsule deux à trois gouttes d'essence de moutarde. L'évaporation obtenue, on continue le dosage comme l'a indiqué Pasteur.

Voici les résultats obtenus dans les conditions de l'expérience, c'est-à-dire en opérant sur des vins ayant fermenté normalement et sans retard appréciable les uns par rapport aux autres.

	TÉMOIN	BEAUJOLAIS	MÉDOC	ROMANÉE	VERZENAY
	—	—	—	—	—
Blancs filtrés. .	7,64	7,42	8,34	7,50	6,87
Blancs chauffés.	7,72	7,56	8,60	7,60	6,88
Blancs sulfités .	7,50	7,50	7,82	7,56	7,42
Rouges filtrés. .	6,18	6,06	6,82	5,96	5,80
Rouges chauffés.	5,96	6,00	6,96	6,10	5,96
Rouges sulfités .	6,02	6,10	6,12	5,98	5,96

Par l'examen des quantités de glycérine, on s'aperçoit que l'atténuation que l'on a observée pour certains extraits secs pourrait bien être due à un manque de glycérine.

La moyenne de cet élément ressortira (fig. 4) pour chacun des ferments et pour les essais blancs ou rouges à :

	TÉMOIN	BEAUJOLAIS	MÉDOC	ROMANÉE	VERZENAY
	—	—	—	—	—
Blancs	7,62	7,49	8,25	7,55	7,05
Rouges. . . .	6,05	6,05	6,63	5,98	5,90

Si on se rapporte à la richesse saccharine initiale du milieu, on voit que la quantité de glycérine formée se trouve être dans le rapport de 3,4 à 4 p. 100 du poids du sucre (1). Voici, en effet, la valeur de chacun de ses rapports :

TÉMOIN	BEAUJOLAIS	MÉDOC	ROMANÉE	VERZENAY
—	—	—	—	—
3,6	3,59	3,96	3,59	3,44

(1) Les variations de la glycérine dans mes essais sont donc loin d'être comparables à celles signalées par M. Laborde. Cet auteur prétend en effet que diverses levures pures ont donné des proportions de glycérine variant entre 2,50 et 7,75 p. 100 du poids de sucre. Il me paraît difficilement admissible que ces différences soient obtenues dans les mêmes milieux, car il faudrait supposer alors que l'extrait sec, très normal dans un cas, serait énorme dans l'autre. Autrement dit, pour un vin de 12 degrés on aurait des différences entre les deux extraits pouvant atteindre 10,70 grammes.

Contrairement à ce qui a été avancé par certains auteurs, il n'y a pas, tout au moins dans mes conditions d'expérience, de rapport constant entre les quantités de sucre détruit et de glycérine. On remarque, par contre, que la levure qui donne le maximum de glycérine est la plus pauvre en alcool (Médoc); inversement, le Verzenay, riche en alcool, est pauvre en glycérine.

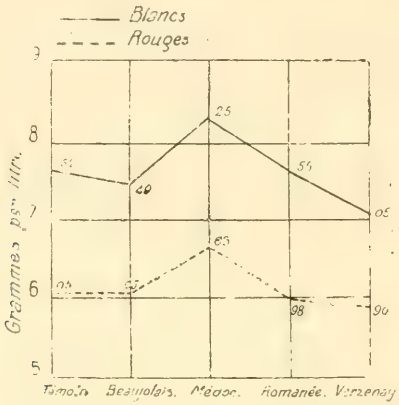


Fig. 4. — Variation de la glycérine (en grammes et *centigrammes*).

A propos du dosage de la glycérine, j'ai voulu me rendre compte de la valeur de l'évaporation qui peut se produire au moment où on fait les extraits secs. Cette évaporation est relativement faible; en effet, si on considère les différences qui existent entre les extraits dans le vide et à 100 degrés, on voit qu'elles ne sont pas toujours proportionnelles à la quantité de glycérine renfermée dans le milieu. Voici la valeur du rapport existant entre les différences des deux extraits et le poids de l'extrait à 100 degrés :

	TÉMOIN	BEAUJOLAIS	MÉDOC	ROMANÉE	VERZENAY
Blancs. . .	7,25 p. 100	8,73 p. 100	13,00 p. 100	6,56 p. 100	14,00 p. 100
Rouges. . .	6,04 p. 100	8,50 p. 100	10,37 p. 100	6,13 p. 100	12,74 p. 100

On se rend compte, par cela, que la méthode de dosage qui se baserait sur les différences des extraits pour déterminer la glycérine serait complètement erronée.

Bilan des matières extractives. — Connaissant la valeur des extraits secs dans le vide et la majeure partie des constituants, on peut essayer de déterminer le bilan des matières extractives : on verra, par cette étude, qu'on arrive à reconstituer, à peu de chose près, le poids de l'extrait.

Les différences qu'on relève s'appliquent aux corps non dosés (matières pectiques, matières azotées, eau de constitution des sels déshydratés) ainsi qu'aux corps nouveaux formés pendant l'incinération, et notamment aux pyrosels, de molécule ordinairement plus condensée que les sels primitifs d'où ils proviennent. (Voir tableau ci-contre.)

Comme on le voit, la proportion de matières non dosées n'est pas très considérable et peut très bien être regardée comme représentant sensiblement les nombreux corps azotés, phosphatés, chlorurés, brûlés ou transformés. On remarque également qu'entre toutes les levures, celle qui paraît laisser le maximum de corps est la levure de Médoc, dont on a déjà vu les nombreuses particularités. Celles qui paraissent en donner moins sont les ferments de Verzenay et de Beaujolais.

En résumé, on peut tirer de l'ensemble de ces données la conclusion suivante : *toutes les levures ont une façon spéciale de se comporter vis-à-vis des matières extractives, et leur action porte surtout sur la production de glycérine et d'acide succinique.* L'acide sulfureux paraît agir comme agent de conservation de l'extrait; toutes les levures, soit qu'elles se trouvent dans de plus mauvaises conditions de travail, soit qu'au contraire cet agent antiseptique joue dans le milieu fermentescible le rôle joué par les fluorures dans les fermentations industrielles, donnent sensiblement les mêmes quantités de glycérine.

Variations des éthers.

La quantité d'acides volatils étant différente selon les ferments examinés, je me suis demandé si le poids d'éther par litre suivrait une marche parallèle à celle des acides. J'ai adopté, pour leur recherche, la méthode indiquée par M. Gayon.

BILAN DES MATIÈRES EXTRACTIVES EN GRAMMES PAR LITRE

		EXTRAIT dans le vide.	ACIDE tartrique combiné.	ACIDE tartrique libre.	ACIDE succinique.	ACIDE citrique.	AC. AUTRES en acide malique.	GLYCÉRINE	MATIÈRES minérales autres que CO^3K^2	TANIN	MATIÈRES non dosées
Blancs :											
Filtrés.	Témoin ..	17,40	3,510	0,900	1,530	»	2,253	7,640	0,350	0,360	0,857
	Beaujolais.	16,95	3,180	0,960	1,400	»	2,490	7,420	0,533	0,370	0,597
	Médoc. . .	18,45	3,140	0,900	1,800	»	2,170	8,340	0,658	0,360	1,082
	Romanée .	17,70	3,550	0,900	1,560	»	2,510	7,500	0,620	0,360	0,700
	Verzenay .	16,40	3,420	0,890	1,350	»	2,410	6,870	0,540	0,360	0,560
Chauffés.	Témoin . .	18,00	3,500	0,773	1,550	»	2,584	7,720	0,696	0,360	0,817
	Beaujolais.	17,85	4,045	0,767	1,600	»	2,386	7,560	0,676	0,350	0,466
	Médoc. . .	19,35	4,170	0,717	1,750	»	2,721	8,600	0,690	0,360	0,942
	Romanée .	18,35	4,045	0,720	1,550	»	2,723	9,600	0,746	0,360	0,641
	Verzenay .	17,60	3,960	0,850	1,300	»	3,053	6,880	0,736	0,360	0,461
Sulfités.	Témoin . .	17,90	3,510	0,620	1,600	0,150	2,770	7,500	0,450	0,360	0,940
	Beaujolais.	17,85	3,345	0,580	1,650	0,150	2,820	7,500	0,753	0,360	0,692
	Médoc. . .	19,25	3,845	0,670	1,650	0,150	2,916	7,820	0,773	0,360	1,066
	Romanée .	18,05	3,260	0,580	1,560	0,150	2,938	7,560	0,824	0,360	0,788
	Verzenay .	17,95	3,470	0,580	1,530	0,150	2,946	7,420	0,867	0,360	0,627
Rouges :											
Filtrés.	Témoin . .	21,50	4,543	1,820	1,300	0,100	5,966	6,180	0,333	0,380	0,878
	Beaujolais.	20,20	4,500	1,630	1,350	0,100	5,310	6,060	0,350	0,380	0,627
	Médoc. . .	22,35	4,253	1,470	1,500	0,150	6,456	6,820	0,299	0,380	1,022
	Romanée .	21,20	4,543	1,410	1,250	0,100	6,530	5,960	0,293	0,380	0,734
	Verzenay .	20,60	4,253	1,280	1,080	0,100	6,809	5,800	0,359	0,380	0,519
Chauffés.	Témoin . .	21,70	4,750	1,740	1,100	»	6,632	5,960	0,377	0,380	0,761
	Beaujolais.	20,55	4,420	1,560	1,300	»	6,119	6,000	0,338	0,380	0,433
	Médoc. . .	22,30	4,060	1,250	1,450	»	6,755	6,960	0,550	0,380	0,895
	Romanée .	21,15	4,420	1,150	1,350	»	6,730	6,100	0,418	0,380	0,592
	Verzenay .	20,55	4,060	1,290	1,100	»	6,773	5,960	0,560	0,380	0,427
Sulfités.	Témoin . .	22,10	3,970	1,330	1,200	0,500	6,986	6,020	0,763	0,380	0,951
	Beaujolais.	21,60	4,012	1,250	1,320	0,200	6,917	6,100	0,738	0,380	0,683
	Médoc. . .	22,45	3,970	1,150	1,350	0,400	6,974	6,120	0,803	0,380	1,103
	Romanée .	21,50	4,094	1,300	1,200	0,300	6,830	5,880	0,718	0,380	0,798
	Verzenay .	21,50	3,970	1,200	1,200	0,200	7,225	5,960	0,753	0,380	0,612

D'après cet auteur, quand on distille 110 cent. cubes de vin et qu'on en recueille 100 cent. cubes, autrement dit, quand on emploie la méthode de Duclaux à la recherche de l'acidité volatile, il y a dans le distillat les 80 p. 100 de l'acidité volatile et des deux tiers des éthers contenus dans le vin. J'ai voulu, pour les essais particuliers que j'ai faits, employer cette méthode en la contrôlant, et je suis arrivé à des résultats très comparables à ceux de M. Gayon.

L'acidité volatile déterminée à l'aide d'eau de chaux, j'ajoutais un fort excès de soude vingtième normale, puis je faisais bouillir une heure avec réfrigérant à reflux. L'excès de soude était ensuite neutralisé avec une solution d'acide sulfurique, également vingtième normale. Voici les résultats des essais de contrôle. Les chiffres donnés représentent le nombre de centimètres cubes de liqueur de soude $\frac{N}{20}$ employés à la saponification des éthers.

PREMIER ESSAI SUR VINS ISSUS DE MOÛTS SULFITÉS

	BEAUJOLAIS	MÉDOC	BOMANÉE	VERZENAY
	—	—	—	—
	cc.	cc.	cc.	cc.
1re distillation .	4,5	3,9	5,5	3,30
2e distillation .	1,8	1,5	0,9	1,16
3e distillation .	0,5	0,5	0,2	0,55
4e distillation .	»	»	0,2	»
5e distillation .	»	»	»	»
Total	6,8	5,9	5,3	5,00
Proportion p. 100 de la 1re distillation.	66,17	66,10	66,00	66,30

DEUXIÈME ESSAI SUR VINS ISSUS DE MOÛTS CHAUFFÉS

	cc.	cc.	cc.	cc.
1re distillation .	3,3	5,2	4,2	4,8
2e distillation .	1,0	1,3	1,4	1,2
3e distillation .	0,5	0,9	0,5	0,8
4e distillation .	0,2	0,4	0,2	0,4
5e distillation .	»	»	»	»
Total. . . .	5,0	7,8	6,3	7,2
Proportion p. 100 de la 1re distillation.	66,30	66,60	66,60	66,60

La vérification étant faite, j'ai procédé à la recherche des

éthers de tous les essais. Voici les résultats en acétate d'éthyle et en grammes par litre :

	TÉMOIN	BEAUJOLAIS	MÉDOC	ROMANÉE	VERZENAY
	—	—	—	—	—
Blancs filtrés . . .	0,195	0,195	0,228	0.201	0,299
Blancs chauffés . .	0,195	0,159	0,208	0,159	0,228
Blancs sulfités . .	0,208	0,159	0,232	0,208	0,265
Rouges filtrés. . .	0,195	0,171	0,220	0,195	0,232
Rouges chauffés. .	0,318	0,293	0,330	0,305	0,342
Rouges sulfités . .	0,159	0,171	0,208	0,183	0,233

De tous les essais, ceux qui sont les plus riches en éthers sont ceux qui ont été ensemencés avec les levures de Médoc et de Verzenay. Il semblerait donc qu'il y ait une relation entre l'acidité volatile et l'éther, mais il n'y aurait pas proportionnalité entre ces deux éléments. En effet, le Verzenay, quoique toujours moins riche en acide volatil, est souvent aussi chargé en éther que les essais ensemencés de Médoc. On voit, d'autre part, que la quantité d'acides éthérifiés n'est pas très considérable dans les vins du Midi. Il ressort cependant de ces recherches que *toutes les levures ont une faculté qui leur est propre de produire plus ou moins d'éthers.*

Conclusions.

Ces conclusions peuvent être de deux ordres : théoriques et pratiques.

Au point de vue théorique, elles se résument dans les quelques points suivants :

1° Toutes les levures ne réagissent pas de la même manière vis-à-vis d'un même milieu, et cela tant au point de vue organoleptique qu'au point de vue chimique;

2° On observe chez quelques-unes d'entre elles une faculté d'atténuation comparable à celle observée depuis longtemps pour certaines levures de brasserie. L'atténuation observée, plus particulièrement chez la levure de Verzenay, porte surtout sur la glycérine et l'acide succinique;

3° La levure de Médoc donne toujours un extrait sec plus considérable que celui que l'on trouve dans les autres milieux,

sans qu'il y ait pour cela un restant de matières réductrices non utilisées.

4° Certaines levures, celle de Médoc en particulier, ont une propension toute particulière à la production d'acides volatils.

5° La production par quelques levures d'acidité volatile en proportion plus considérable, n'est pas corrélative à la présence dans le milieu de germes pathogènes, tels que la tourne, qui, utilisant à leur profit une partie du sucre, donnent des acides volatils et appauvrissent le milieu en alcool. On se trouve donc bien en présence d'un caractère biochimique nettement déterminé.

6° Les acides fixes sont différemment et plus ou moins attaqués par les diverses levures. L'acide tartrique lui-même, considéré ordinairement comme inattaquable, ne se retrouve pas avec la même valeur dans tous les essais; celui qui, cependant, paraît être le plus fragile, est l'acide malique, ou tout au moins celui que nous avons considéré comme tel; il est différemment attaqué par chacune des levures. La levure de Verzenay paraît être moins avide de cet acide que les autres; elle partage cette propriété avec la levure de Médoc. Cela explique pourquoi, organoleptiquement, les produits provenant de moûts ensemencés avec le Verzenay paraissent plus acides que ceux ensemencés avec la levure de Beaujolais par exemple. Leurs produits n'accusent cependant pas, à l'analyse générale, de différences sensibles entre les acidités totales.

7° La quantité d'éthers contenus dans les vins paraît également tenir à la biologie des ferments. En effet, il n'y a pas toujours correspondance absolue entre les quantités d'acides volatils déterminés et la quantité d'éthers formés. Le Verzenay donne ici encore une quantité d'éthers supérieure à celle que l'on rencontre dans les autres essais.

Au point de vue de l'analyse des vins, on peut tirer des expériences que j'ai entreprises, des conclusions intéressantes. En effet, un vin naturel ensemencé avec du Verzenay et ayant peu cuvé, pourrait être à tort inculpé de vinage, car le rapport entre le poids de l'alcool et de l'extrait sera relativement fort. En effet, si mes essais en rouge ne peuvent être considérés comme représentant le type des vins de vendange entière, ils peuvent, au contraire, être assimilés aux vins rosés. Dans ce

cas, si on applique à la recherche du vinage le chiffre 4,6 comme valeur maxima du rapport extrait, on s'aperçoit notamment que, dans les essais de 1911, tous les vins peuvent être considérés comme vinés et dans des proportions comprises entre 5 et 27 p. 100.

Au point de vue pratique, la connaissance des propriétés de chaque levure pourra ouvrir un champ nouveau à l'application du levurage en vinification. En s'en tenant seulement aux différences enregistrées entre les caractères organoleptiques imprimés aux mêmes milieux par les levures de Verzenay et de Beaujolais, on se rend compte que, dans les pays chauds, où le manque d'acidité est la règle générale, il y aura intérêt à employer une levure telle que celle de champagne, susceptible, ainsi que nous l'avons vu, de conserver le maximum de fraîcheur aux produits qui en dérivent. Dans les pays froids, par contre, où l'acidité est ordinairement très grande, on aura intérêt à adopter des levures qui atténuent cette acidité.

Le travail auquel je me suis livré n'a pas la prétention d'être complet ; il faudrait, pour cela, faire porter la même étude sur tous les ferments indigènes et sélectionnés provenant des raisins. J'ai voulu par ces recherches apporter une simple contribution à la biochimie des levures les plus communément employées dans le midi de la France. Je me propose d'ailleurs, dans une étude ultérieure, de pousser mes recherches plus loin, de manière à fixer, d'une manière aussi précise que possible, les conditions d'emploi des levures en vinification.

BIBLIOGRAPHIE

C. Amthor. — Studien über reine Hefen. *Zeitschrift für physiologische Chemie*, XII (1888).

A. Bernard. — *Acidimétrie des moûts, vins et vinaigres par la méthode volumétrique gazeuse* (1898).

A. Bouffard et Dupont. — L'acidimétrie des moûts et des vins par la méthode volumétrique gazeuse. *Revue de viticulture* (1898).

Duclaux. — Sur la conservation des levures. *Ann. de l'Institut Pasteur* (1889)

E. Dupont. — L'acide citrique naturel des vins. *Revue de viticulture* et *Ann. de chimie analytique* (1908).

E. Dupont. — La méthode volumétrique gazeuse en acidimétrie. *Progrès agricole* (1912).

E. Dupont et J. Ventre. — L'acide sulfureux en vinification. *Progrès agricole* (1906-1908); *Annales de l'Ecole d'Agriculture* (1907).

Effront. — Influence de l'acide fluorhydrique et des fluorures sur les levures de bière. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences* (1893).

C. Forti. — Contribuzione alla conoscenza dei lieviti di vino. *Stazioni sperimentali agrarie italiane*, XXI (1891).

Gayon. — *Sur les éthers du vin.* Bordeaux (1903).

Jacquemin. — Du saccharomyces ellipsoideus et de ses applications industrielles à la fabrication d'un vin d'orge. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences* (1888).

Kayser. — Contribution à l'étude des levures de vin. *Annales de l'Institut Pasteur*, VI (1892).

Kayser et Barba. — Rapport sur des expériences de vinification faites dans le Gard. *Bull. du ministère de l'Agriculture* (1893-1903).

Laborde. — Sur les variations de la production de glycérine pendant la fermentation alcoolique du sucre. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences* (1899).

Laer et Denamur. — Notice sur une levure à atténuation limite très élevée. *Moniteur scientifique* (1895).

E. Mach et K. Portele. — Ueber die Veränderungen im Gehalt von Gesamtsäure und Glycerin während der Gährung und Lagerung der Weine. *Versuchsstationen*, XLI (1892), Berlin.

Martinand et Rietsch. — Des microorganismes que l'on rencontre sur les raisins mûrs et de leur développement pendant la fermentation. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences* (1890).

L. Marx. — Les levures de vin. *Moniteur scientifique* (1888).

Mestrezat. — L'acide malique dans les moûts et les vins. *Ann. chimie analytique* (1907).

Pasteur. — *Etudes sur le vin* (1872).

Pasteur. — *Etudes sur la bière* (1876).

Pichi. — Sulla fermentazione del mosto di uva con fermenti selezionati. *Annali della R. Scuola di viticultura e di œnologia in Conegliano* (1892).

Rietsch. — De la possibilité de communiquer divers bouquets aux vins par addition à la cuve de levures cultivées. *Bull. de la Société d'Agriculture* (1890).

Rommier. — Sur la possibilité de communiquer le bouquet d'un vin de qualité à un vin commun en changeant la levure qui le fait fermenter. *Bull. de la Société chimique de Paris* (1889).

Rosenstiehl. — Procédé de vinification par stérilisation des moûts. *Revue de viticulture* (1897).

Rosenstiehl. — Sur les vins obtenus par chauffage préalable de la vendange. *Revue de viticulture* (1899).

Rosenstiehl — Sur le bouquet des vins obtenus par la fermentation des moûts stérilisés. *Revue de Viticulture* (1900).

Rosenstiehl. — Rôle des levures et du cépage dans la formation du bouquet des vins. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences* (1908).

Seifert et Reisch. — Entstehung des Glycerins bei der alkoholischen Gährung. *Centb. f. Bact. und Paras.*, XII (1904).

J. Ventre. — *Les levures en vinification.* Montpellier (1911).

J. Wortmann. — Anwendung und Wirkung reiner Hefen in der Weinbereitung, Untersuchungen ueber reine Hefen. *Landw. Jahrbücher* (1892-1894).

LE COCCOBACILLE DES SAUTERELLES

par F. D'HERELLE

I

LES SAUTERELLES

Historique. — De tout temps, les sauterelles ont été considérées comme un véritable fléau. Tous les pays tropicaux et subtropicaux en souffrent périodiquement, et si, maintenant, grâce à la facilité des échanges, la faim et son cortège obligé d'épidémies peut être évitée, les pertes matérielles sont souvent très élevées, se chiffrant parfois à plusieurs centaines de millions.

La Bible, les historiens grecs, latins et arabes nous ont conservé le souvenir d'un grand nombre d'invasions suivies de famines et d'épidémies qui ont décimé les régions envahies par les sauterelles. Dans les temps modernes, les ravages de ces insectes n'ont pas été moins redoutables.

Depuis la conquête, l'Algérie a compté plus de vingt-cinq années d'invasion, et la Métropole a souvent dû venir en aide à la colonie envahie en votant des crédits spéciaux pour l'organisation de la lutte contre le redoutable insecte. Il n'y a pas cinquante ans, en 1867-68, la famine amenée par une invasion de *Schistocerca peregrina* causa la mort de plus de 500.000 Arabes.

Extension. — Plus de la moitié de la surface de la terre est soumise aux incursions périodiques des sauterelles. En Europe, le sud de l'Espagne, de l'Italie, la Grèce, les Etats balkaniques, la Hongrie, le sud de la Russie et les îles de la Méditerranée; toute l'Afrique, à l'exception des parties centrales boisées et humides; Madagascar; l'Asie en entier; les Philippines, Bornéo et, en général, toutes les grandes îles du Pacifique et

de l'océan Indien; l'Australie et la Nouvelle-Zélande; l'Amérique, depuis le Canada jusqu'à la Terre de Feu, à l'exception de la partie orientale des Etats-Unis, d'une partie de l'Amérique centrale et des vallées humides et chaudes des grands fleuves brésiliens.

Biologie. — Les acridiens migrateurs, *vulgo* : sauterelle, quand il s'agit de l'insecte parfait ailé; criquet, quand l'insecte est encore à l'état de larve aptère; et mouche, pour cette même larve depuis le moment de l'éclosion jusqu'à la première mue, appartiennent à la famille des Orthoptères sauteurs, qui se divise en Locustides et Acrides.

Les Locustides, qui se reconnaissent à leurs longues antennes et au long oviscapte de la femelle, sont communes en Europe; on ne compte parmi elles aucun insecte nuisible.

Les Acrides ont toujours les antennes plus courtes que la moitié de la longueur du corps, et les femelles sont dépourvues d'oviscapte. On pourrait diviser les Acrides en deux catégories :

1° Les grands migrateurs, qui vivent dans les régions tropicales et envahissent pendant l'été les contrées sub-tropicales et même tempérées. Espèces essentiellement voyageuses qui peuvent franchir d'énormes distances, plusieurs milliers de kilomètres; le temps d'incubation est relativement court, de quinze à quarante jours suivant la température ambiante; quoique ordinairement végétariennes, elles sont omnivores, malgré l'assertion contraire que l'on trouve dans tous les traités d'entomologie, et les criquets se dévorent voracement entre eux, ce qui, je crois, est la principale cause de la limitation de l'espèce. Les deux espèces principales sont : *Schistocerca peregrina* Olivier, dans l'ancien Continent, et *Schistocerca americana* Drury, en Amérique; ces deux espèces sont d'ailleurs tellement voisines qu'en réalité elles n'en forment qu'une seule et doivent provenir de la même souche, comme l'a prétendu Giard.

2° Les petits migrateurs qui vivent dans les contrées subtropicales et tempérées et qui se sont adaptées aux conditions climatériques de ces régions : la ponte a lieu à la fin de l'été, les œufs passent l'hiver en terre et l'éclosion a lieu au printemps suivant. Les principales espèces sont : *Stauronautus maroccanus*, *Caloptenus italicus*, *Pachytylus migratorius*, dans

l'ancien Continent; *Caloptenus spretus*, dans l'Amérique du Nord; et un *Caloptenus* (sp?), dans le Sud de la République Argentine.

Schistocerca americana. — Pour la compréhension de la suite de ce mémoire, je dois entrer dans quelques détails sur les mœurs de cet insecte. A l'exception des données géographiques, naturellement, tout ce que j'en dirai se rapporte également à *Schistocerca peregrina.*

Insectes de grande taille, les *Schistocerca* adultes mesurent de 6 à 7 centimètres de longueur. La femelle pond de quatre à onze fois à un intervalle de quinze à quarante jours; chaque ponte se compose de soixante à quatre-vingt dix œufs, déposés en une seule fois dans un trou perforé dans le sol par l'insecte; ces œufs sont enrobés dans une sécrétion mucilagineuse qui se parchemine et les protège contre les moisissures et empêche qu'ils ne se dessèchent. Suivant la température, les œufs éclosent de quinze à quarante jours après la ponte. L'évolution des larves ou criquets dure de quarante à soixante jours, suivant la température et la quantité d'aliments dont ils disposent; pendant ce laps de temps, l'insecte subit cinq mues successives. Dépourvus d'ailes, les criquets s'avancent en courant sur le sol; effrayés, ou désirant franchir un obstacle, ils progressent par bonds qui peuvent atteindre une vingtaine de centimètres en hauteur et 30 en longueur. Immédiatement au sortir de l'œuf a lieu une première mue; six à huit jours après, une seconde; entre ces deux mues, les jeunes criquets ou mouches ne se déplacent pas, les bandes restent groupées en amas compacts; la seconde mue effectuée, elles se mettent en marche et forment les colonnes si redoutées; elles commencent à franchir une centaine de mètres par jour; les criquets grandissent peu à peu et arrivent à parcourir aisément plus de 5 kilomètres en vingt-quatre heures. Les criquets marchent de jour, se reposent de nuit, mangeant de jour comme de nuit; ils sont d'une voracité extraordinaire; les bandes marchent droit devant elles, ravageant tout sur leur passage, herbe, moissons, feuilles et même l'écorce des arbres: derrière elles, le sol est semblable à une aire de terre battue; les insectes sont tellement pressés les uns contre les autres qu'une bande, traversant une voie de chemin de fer, arrête les trains dans leur marche; la locomo-

tive patine sur la couche grouillante ; il n'y a qu'à attendre que la colonne soit passée, parfois des heures entières.

Fig. 1.

1. Sauterelle adulte normale (*Schistocerca americana*).
2. Sauterelle adulte normale capturée dans les bandes infestées à Rafaela (République Argentine).
3. Criquet (larve) normal de *Schistocerca americana*.

La digestion, chez les acridiens, n'est pas poussée à un stade avancé ; les excréments sont composés de débris végétaux dont

la structure n'est même pas altérée, et ils donnent l'impression que, seuls, les sucs sont assimilés; chose étrange, le contenu intestinal est parfois aseptique et, en tous cas, la flore en est toujours remarquablement pauvre, contrairement à ce qu'on observe chez les herbivores; les matières ingérées ne font que traverser le tube intestinal, n'y séjournant que quelques minutes; tout cela explique la quantité énorme de nourriture que ces insectes doivent absorber pour subsister, plusieurs fois leur propre poids en vingt-quatre heures.

Comme je l'ai déjà fait remarquer, les sauterelles, et surtout les criquets, se dévorent avidement entre eux; aussitôt que l'un d'eux est, pour une cause quelconque, affaibli, les autres se jettent sur lui et le mangent. Il arrive souvent que des bandes se composent de criquets de différentes tailles, soit que les éclosions ne se soient pas faites à la même époque, soit que des bandes d'âge différent se soient mélangées; dans ce cas, surtout dans les régions arides où la nourriture est rare, les criquets les plus âgés arrivent à dévorer tous les plus jeunes; le plus puissant ennemi de la sauterelle, c'est la sauterelle elle-même.

La durée de la période larvaire est de quarante jours à deux mois, suivant les circonstances locales; après une sixième mue, l'insecte est parfait. Les sauterelles ailées restent une vingtaine de jours dans la région où a eu lieu la dernière mue, volant de-ci de-là, puis elles se réunissent en bande et s'envolent.

Dans la République Argentine, les vols d'invasion apparaissent vers la fin d'août ou en septembre. Ils viennent du Nord (1), voyageant toujours de jour et se reposant de nuit. Les vols s'abattent sur les provinces de Corrientes, Entre-Rios, Chaco, Santa-Fe, Cordoba, la partie orientale de San Luis et de San Juan, plus rarement, et seulement quand le printemps est chaud, sur les provinces de Buenos-Aires et les territoires du Sud. Les sauterelles pondent dans ces provinces. Les jeunes éclosent pendant les mois d'octobre et de novembre, errent dans la contrée pendant la période de leur vie larvaire, prennent

(1) Inutile de rappeler que les saisons, dans la République Argentine, qui se trouve dans l'hémisphère sud, sont inverses de celles d'Europe; le printemps commence le 20 septembre, l'été le 21 décembre, l'automne le 20 mars et l'hiver le 21 juin.

les ailes pendant les mois de décembre et de janvier, se réunissent en vols fin janvier ou en février, et prennent une direction ouest ou nord-ouest. Comme je l'ai dit, les sauterelles arrivant du Nord forment des vols compacts, ressemblant de loin à de gros nuages sombres; par contre, en retournant au Nord ou à l'Ouest, les bandes sont en ordre dispersé et volent toujours de nuit; pendant leur premier et court voyage de l'Est à l'Ouest, elles se reposent de jour; quand elles gagnent ensuite définitivement le Nord, elles se reposent parfois également la journée, mais on observe aussi des vols de nuit qui se continuent de jour et, dans ce cas, les bandes sont à une très grande hauteur, indice que ces vols vont franchir une longue distance; on a remarqué que la hauteur du vol dans l'atmosphère est en relation avec la distance que les insectes désirent franchir sans arrêt.

La rapidité de déplacement des vols est très grande; on a noté avec certitude des distances de 150 kilomètres franchies en une seule nuit (1).

Arrivées dans les provinces occidentales, San Juan, San Luis, Tucuman, Santiago del Estero, Catamarca et La Rioja, les sauterelles nées dans les provinces orientales pondent une première fois, puis elles suivent leur route vers le Nord, pondent une seconde fois dans les provinces septentrionales : Salta, Jujuy et Chaco; les unes restent dans ces régions, où elles passent l'hiver; les autres poursuivent leur route en Bolivie et, sans doute, beaucoup plus loin; nous reviendrons sur cette question. Les œufs laissés éclosent environ un mois après la ponte; les criquets parcourent la région et, arrivés à l'état

(1) M. Kunckel d'Herculais (Le grand acridien migrateur américain, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 25 mars 1901.) établit l'unicité de l'espèce migratrice américaine; à ceci rien à redire; mais, sur un point de sa Note, je suis en désaccord formel avec lui.

Le professeur Giard, en 1891, et S. Scudder, en 1899, admirent que *Schistocerca peregrina* Olivier, le grand acridien de l'ancien continent, est d'origine américaine; M. Kunckel d'Herculais s'élève contre cette opinion en se basant uniquement sur le fait que les *Schistocerca* ne volent, et même ne peuvent voler durant la nuit : « Ce n'est, dit-il, qu'aux heures les plus chaudes de la journée qu'ils s'élancent dans l'espace; dès 3 ou 4 heures du soir, alors que le soleil baisse sur l'horizon, ils se rapprochent du sol...; le soir, ils sont donc forcés d'atterrir. » Ceci est faux; comme je l'ai dit, quand les sauterelles regagnent le Nord, en février, mars et avril, elles volent toujours de nuit. Au Yucatan j'ai également observé souvent des vols de nuit, et là, quelle que soit l'époque de l'année, si les nuits sont chaudes, le vol de nuit est de règle.

adulte, partent également vers le Nord. Au printemps suivant, le cycle décrit recommence.

Les sauterelles qui envahissent la République de l'Uruguay, le Paraguay et le sud du Brésil proviennent des vols qui fondent sur la République Argentine ; les jeunes sauterelles qui proviennent de leurs pontes vont également pondre dans les provinces occidentales de cette République et gagnent ensuite le Nord.

Bien des questions restent obscures dans la biologie des acridiens migrateurs. Trois de ces questions nous intéressent particulièrement, car elles sont étroitement liées au problème de la lutte contre la sauterelle.

Quelle est d'abord l'aire de l'extension de *Schistocera peregrina* dans l'ancien continent et de *Schistocerca americana* dans le nouveau ? N'ayant observé personnellement que cette dernière espèce, d'elle seule je m'occuperai, mais, certainement, bien des constatations faites doivent s'appliquer aussi bien à l'une qu'à l'autre.

Si nous suivons la classification des entomologues américains, il existerait trente-trois espèces (1) appartenant au genre *Schistocerca*, espèces, les unes localisées dans une contrée, les autres s'entremêlant bizarrement entre elles sur toute l'étendue du continent, ce qui est assez étrange pour des espèces essentiellement migratrices (2). Au contraire, suivant les entomologues français, il n'existe qu'une seule espèce d'acridiens grands migrateurs en Amérique : *Schistocerca americana* Drury (3) ; tout semble leur donner raison et les arguments de M. Kunckel d'Herculais entre autres paraissent péremptoires. Personnellement, je puis apporter une contribution à cette étude ; j'ai observé une grande variation chez les divers individus, criquets ou sauterelles, appartenant à une même bande, c'est-à-dire certainement de la même espèce, variations de

(1) *Biologica Centrali Americanæ*, pars « Entomology ».

(2) Pour donner une idée de la facilité avec laquelle les entomologues créent des espèces nouvelles, je citerai ce fait d'après M. Kunckel d'Herculais. Les *Schistocerca* jeunes adultes ont une teinte rosée, qui passe peu à peu au jaune en vieillissant, eh bien, Conil créa pour la première l'espèce *Schistocerca riojana*, pour la seconde *Sc. automnalis*. Des erreurs de même nature sont probables pour les espèces de l'ancien continent.

(3) M. le professeur Bouvier tient également pour l'unicité.

teinte, de macules et de taille; j'ai trouvé des adultes qui ne mesuraient que 44 millimètres de long et d'autres qui allaient jusqu'à 76; j'en ai rencontré qui ne présentaient pas de macules, et dont la teinte était uniformément jaune clair, presque blanc. J'ai observé de plus qu'il existe en Amérique deux aires de dispersion de *Schistocerca americana*, sans communication entre elles, si ce n'est accidentellement; la première est constituée par toute l'Amérique du Sud, la seconde comprend les Etats du sud du Mexique, d'où partent parfois des vols qui vont s'abattre sur les Etats-Unis jusque dans l'Etat de l'Illinois. Ces deux aires sont séparées par les divers Etats de l'Amérique centrale où n'existent pas de *Schistocerca*; au Guatemala, jamais on n'a observé d'invasions depuis plus de trente ans, époque sur laquelle j'ai pu obtenir des renseignements précis et nombreux, ayant parcouru ce pays pendant près de trois ans.

Jusqu'où vont les jeunes sauterelles qui retournent vers le Nord? Second point obscur dans la biologie de ces insectes. On a parlé de foyers d'invasion ou de régions d'habitat permanent leur assignant une contrée déterminée, seulement on n'a jamais pu la trouver, ce qui ne devrait pas être bien difficile : l'espace où peuvent se loger et trouver leur nourriture les sauterelles qui ont couvert plus de trois millions de kilomètres carrés, comme cela est arrivé souvent dans la République Argentine, ne peut guère passer inaperçu (1). En réalité, ces foyers d'invasion n'existent pas, du moins avec le sens qu'on leur a attribué jusqu'ici. Me basant sur des faits qu'il serait trop long d'énumérer (2), j'ai montré qu'il était très probable que les *Schistocerca americana* vont et viennent sur toute l'étendue de l'Amérique du Sud, sur toute l'aire de l'extension de l'espèce. Suivant les vents régnants, les conditions climatériques, le régime des pluies, en un mot suivant les divers facteurs cosmiques, les vols se dirigent vers une région ou vers une autre. Si l'on veut conserver l'expression de région permanente, celle-ci serait constituée, en Amérique du Sud, par toutes les contrées où la température permet la vie de l'insecte pendant toute l'année, c'est-à-dire par toute la

(1) Même observation à faire en ce qui concerne l'Afrique.

(2) F. d'Hérelle, 1913, rapport au ministère de l'Agriculture de la République Argentine.

partie située au nord du trentième degré de latitude, qui comprend le nord de la République Argentine, la Bolivie, le Paraguay, presque tout le Brésil, l'Equateur, le Pérou, le Venezuela, la Colombie et la République de Panama. Il n'y a lieu de retrancher de ces régions que les contrées dont les conditions climatériques sont incompatibles avec la vie de l'insecte : les hautes régions andines et les vallées très humides des grands fleuves que les sauterelles évitent avec soin à cause des mycoses qui les y déciment.

La zone temporaire est constituée par le reste de l'Amérique du Sud, qui devient en été, grâce à l'élévation de température, appropriée aux besoins physiologiques de l'insecte.

Les sauterelles vont pondre dans les régions où la végétation est suffisante pour satisfaire la voracité des larves. Les larves ou criquets, une fois arrivées à l'état adulte, si elles se trouvent au sud du trentième degré de latitude, émigrent vers le Nord, si elles sont nées au Nord, donc dans une région où elles peuvent vivre toute l'année, y restent, séjournant parfois plusieurs mois au même endroit, ou parcourent la contrée en quête de nourriture.

Ici se place comme question accessoire celle de la périodicité des invasions. Cette question est restée jusqu'ici obscure parce que chaque pays s'est considéré comme une entité géographique définie, étudiant les invasions de sauterelles en faisant abstraction des pays voisins; on n'a pas centralisé les renseignements concernant les migrations, ce qui fait que le problème de la périodicité, si simple si on envisage un continent tout entier, devient insoluble si chaque pays le considère par rapport à lui seul. La classification erronée des *Schistocerca* n'était d'ailleurs pas faite pour éclaircir le problème, chaque pays croyant avoir à faire avec une espèce distincte de sauterelle (1). En réalité les *Schistocerca* vont et viennent sur toute l'étendue de l'Amérique du Sud; elles séjournent de préférence pendant quelques années dans les États du Nord, puis, après une année de sécheresse ou d'humidité trop prononcée,

(1) Il serait intéressant de vérifier sérieusement si les grands acridiens migrateurs de l'Afrique du Sud ne sont pas des *Schistocerca peregrina*; il serait alors vraisemblable que le nord et le sud de l'Afrique sont visités périodiquement par les mêmes insectes venant du Centre.

refluent en masse vers le Sud, où elles restent quelques années, pour recommencer après une année défavorable la migration en sens inverse. La périodicité des invasions n'est d'ailleurs pas marquée en Amérique comme elle l'est en Afrique (1); chaque année la République Argentine est envahie et la périodicité n'est ici qu'une question de plus ou de moins, et ne s'observe que pour les provinces méridionales, qui sont envahies si les chaleurs sont précoces et ne le sont pas si les mois d'août et de septembre sont froids; les insectes venant du Nord s'abattent alors uniquement sur les provinces septentrionales plus chaudes.

Troisième point obscur : que deviennent après la dernière ponte les sauterelles venues du Nord? Les entomologues ont une réponse très simple; elles meurent. Ce doit être faux, et voici pourquoi; on trouve bien parfois des cadavres sur les lieux de ponte, mais leur nombre est toujours infiniment moindre que celui des sauterelles qui se trouvaient sur les lieux de ponte le jour précédent, et de plus le fait est loin d'être constant. Si on examine avec soin les quelques cadavres restés sur place, on voit que la mort est due à des causes accidentelles : mycoses ou larves de *Sarcophaga*; la mort n'est donc pas alors physiologique. Un fait qui n'a jamais été signalé, je crois, prouve d'ailleurs que la femelle ne meurt pas fatalement après la dernière ponte: quand on observe les bandes de criquets, on trouve toujours, et cela sans aucune exception, quelques femelles adultes qui les accompagnent, qu'il s'agisse de criquets nés de pontes de vieilles sauterelles venues du Nord ou de jeunes sauterelles allant au Nord. Dans la République Argentine, on les nomme des « guias » ou guides. Elles restent sur les lieux après la ponte, alors que toutes leurs compagnes s'envolent, attendent les éclosions, suivent les bandes de criquets dans toutes leurs évolutions et s'envolent avec les jeunes sauterelles après la dernière mue. Quel est le rôle de ces « guides »? Servent-elles réellement de guides aux jeunes sauterelles? Je l'ignore, mais le fait est pos-

(1) En Algérie et dans le nord de l'Afrique, on observe une périodicité vraie; cela tient à ce que ces régions sont séparées par le Sahara, des contrées où l'insecte peut vivre toute l'année; les sauterelles, observant la loi du moindre effort, ne traversent cette barrière que si elles y sont forcées.

sible; on en observe de plus curieux que celui-là en étudiant la vie des insectes. En tous cas ce seul fait suffit à prouver que les sauterelles ne meurent pas fatalement après la dernière ponte dans la zone tempérée. Que deviennent-elles alors? Il est possible qu'une fois les pontes effectuées elles reprennent le chemin des régions tropicales, volant de nuit en vols dispersés, comme c'est la règle pour le retour, et que c'est là que se produit la mort physiologique de l'insecte (1).

A première vue, on pourrait considérer comme une digression tout ce qui vient d'être dit sur la biologie des acridiens migrateurs; il n'en est rien. Le problème de la lutte contre la sauterelle est complexe, et sans une connaissance approfondie des mœurs de cet insecte, on risque de courir à un échec complet. En ce qui concerne, par exemple, l'aire de dispersion de *Schistocerca peregrina* ou de *Schistocerca americana*, on comprend que, si cette aire est limitée, la lutte peut s'engager avec chance de réussite dans un seul pays : la République Argentine parvenant à réduire l'espèce *Schistocerca paranensis*, sera tranquille et n'aura rien à craindre de *Schistocerca bogotensis* Scudd., de Colombie, par exemple. Même si l'on tombe d'accord pour admettre l'unicité de l'espèce, l'aire de dispersion s'étend-elle sur toute l'Amérique du Sud, comme je l'ai soutenu, ou bien y a-t-il un foyer argentin, un foyer colombien, etc.? Si l'aire est limitée, la lutte peut s'engager avec chance de réussite dans un seul pays; mais si cette aire s'étend sur tout un continent il sera beaucoup plus avantageux, et le résultat désiré sera plus vite obtenu si la lutte s'engage en même temps dans tous les États qui se trouvent compris dans l'aire d'extension. Depuis deux ans des infestations ont lieu dans la République Argentine; si l'espèce contre laquelle on lutte a une aire limitée à ce seul pays, on pourrait espérer à bref délai réduire l'espèce à un point où elle ne causerait plus de

(1) Les choses se passent de même en Algérie pour *Stauronautus maroccanus*. A la question : que deviennent les adultes après la ponte? la réponse unanime est qu'ils meurent; si l'on insiste sur les circonstances, on obtient non moins unanimement les détails suivants : « Les sauterelles avaient pondu, elles se trouvaient tel jour dans tel champ, le lendemain matin plus de traces, pas de mortes sur le sol, mais s'il n'y avait plus de sauterelles, il était bien sûr qu'elles étaient mortes !!! » Il est plus logique de penser qu'elles s'envolent de nuit et qu'elles gagnent une autre région.

dégâts appréciables; mais si cette aire s'étend sur toute l'Amérique du Sud, les infestations qui ont lieu n'ont aucune répercussion sur les bandes immenses qui dévastent actuellement la Colombie et les autres Etats du Nord, et, malgré tout ce qu'elle aura fait, la République Argentine souffrira une invasion désastreuse quand ces masses d'insectes reflueront vers le Sud. Les infestations devraient donc avoir lieu sur toute l'aire de dispersion de l'insecte.

J'ai pris l'Amérique du Sud comme exemple, on pourrai faire le même raisonnement pour tout autre continent qui souffre des invasions des acridiens migrateurs.

Lutte contre la sauterelle. — Depuis la plus haute antiquité, les peuples menacés ont cherché à se défendre, sans grand succès d'ailleurs, et ce n'est qu'en 1868 qu'un Italien résidant à Chypre, Riccardo Mattei, inventa un procédé de défense réellement efficace, l'appareil cypriote, qui se compose d'une bande de toile d'environ 80 centimètres de largeur, munie à sa partie supérieure d'un liséré de toile cirée d'une dizaine de centimètres; cette bande, de plusieurs kilomètres de longueur, est maintenue verticale au moyen de piquets fichés en terre; les criquets glissent sur la toile cirée et ne peuvent franchir l'obstacle; de place en place on creuse des fosses, les insectes s'y accumulent et on les détruit en les piétinant. Dans la République Argentine, on utilise dans le même but des feuilles de zinc de 40 centimètres de hauteur soudées bout à bout et maintenues verticales par des piquets de fer; on tend maintenant à remplacer les fosses par de simples enclos de quelques mètres carrés disposés tous les 50 mètres sur la ligne de barrière, et constitués également par de la feuille de zinc; les criquets suivent la barrière qu'ils ne peuvent franchir, arrivent au premier enclos, grimpent jusqu'au faite par une rampe spécialement disposée à cet effet, sautent dans l'enclos, d'où ils ne peuvent plus sortir, et meurent étouffés par les masses de criquets qui viennent s'y accumuler. Cette disposition très simple, due à l'ingéniosité de M. Tribodi, inspecteur au ministère de l'Agriculture de la République Argentine, dispense de faire des fosses, toujours coûteuses à établir, et de plus offre l'immense avantage de permettre l'établissement très rapide des lignes de barrière avec une main-d'œuvre réduite au

minimum, ce qui est particulièrement important dans les conditions où l'on est obligé de travailler. Le Gouvernement argentin possède plus de 30.000 kilomètres de ces barrières de zinc. Pour donner une idée du nombre des sauterelles dans les régions envahies, il suffira de dire qu'au moyen de l'appareil qui vient d'être décrit, pendant la campagne de 1908, il fut capturé et détruit 111.747.000 kilogrammes de criquets, ce qui fait plus de cent milliards d'individus, plus 13.385.000 kilogrammes de criquets « mouches », soit environ trois cent milliards; si on ajoute à ce chiffre les œufs, nous arrivons à un total de sept cent milliards, et, malgré cela, suivant les mêmes inspecteurs d'agriculture qui dirigeaient la lutte, c'était absolument comme si on n'avait rien fait, il paraissait y en avoir autant après qu'avant.

Somme toute, l'appareil cypriote est excellent pour protéger les cultures: une ceinture autour d'un champ sauve la récolte; comme moyen de destruction il est inefficace, et les criquets qui échappent à la destruction sont plus que cent fois suffisants pour que la prochaine génération soit aussi nombreuse que la précédente (1). Il faut ajouter que son emploi est impraticable dans les régions incultes et dépourvues de moyens de communications faciles, et que s'il est utile pour la lutte contre le criquet, il ne sert à rien contre la sauterelle adulte ailée : pour celle-là, rien à faire, si ce n'est de la ramasser pour la détruire ensuite, ce qui n'est pas facile et nul quant au résultat.

Le feu, les insecticides les plus divers (2), les machines les plus compliquées ont été proposés tour à tour, jusqu'à d'immenses filets tendus dans l'atmosphère et remorqués par des ballons ou de gigantesques machines électriques destinées à

(1) J'ai vu en Algérie de la barrière de zinc de 25 centimètres de hauteur: il est absolument inutile de se donner la peine d'établir une telle ligne de barrage; les criquets, surtout de *Stauronautus maroccanus*, sautent facilement par-dessus, d'autant plus qu'elle est toujours légèrement inclinée.

(2) Dans l'Afrique du Sud, on a employé la mélasse additionnée d'acide arsénieux, et j'ai vu de nombreux catalogues distribués par des fabriques de produits chimiques préconisant l'emploi de l'arsenic sous diverses formes. Ces pratiques sont déplorables, car si on empoisonne ainsi une certaine quantité de criquets, on empoisonne également les oiseaux insectivores qui en auraient détruit encore bien plus, et l'on se prive de ces précieux auxiliaires dont l'absence se fera cruellement sentir dans un avenir prochain. Il a été prouvé, en particulier, que la quasi-disparition des cigognes, autrefois si nombreuses en Alsace, était due au fait qu'elles étaient mortes

foudroyer les vols (Edison) (1) rien à faire devant la multitude des envahisseurs, et les pays qui ont employé ces procédés de la manière la plus intensive ne sont jamais arrivés à réduire en quoi que ce soit les invasions suivantes, ce qui est bien la condamnation formelle de leur emploi. Si encore la lutte se poursuivait dans des pays très peuplés, entièrement cultivés, il est fort possible que tous ces moyens finiraient par donner un résultat, mais il faut penser que les pays qui souffrent le plus des invasions des sauterelles sont des contrées à faible population, où il existe d'immenses étendues désertes et incultes où les sauterelles se reproduisent tout à leur aise, et chaque femelle pondant des centaines d'œufs, on comprend que, même en supposant que l'on puisse détruire la moitié des sauterelles qui constituent une invasion, ce qui ne sera jamais le cas, on ne réduira en rien l'invasion de l'année suivante.

Je tiens à faire remarquer ici, pour éviter toute équivoque, que l'emploi de l'appareil cypriote est de toute nécessité dans les régions agricoles envahies, même quand la lutte s'engage avec des procédés biologiques. On comprendra aisément que si nous infestons des criquets qui vont envahir un champ, l'épizootie ne se répandra pas instantanément et ne tuera pas les insectes d'une manière foudroyante : avant que l'épizootie ait anéanti les criquets, il se passera quelques jours pendant lesquels tout ce qu'il y a sur le champ aura le temps d'être dévoré. La protection mécanique est donc nécessaire. Il va sans dire que dans les régions incultes, cette protection n'a plus de raisons d'être et que les procédés biologiques seuls sont suffisants.

Les moyens de protection, de lutte défensive sont donc utiles, mais la lutte doit se recommencer chaque année; il est de beaucoup préférable d'engager en même temps une lutte offensive pour arriver non pas à détruire l'espèce, ce qui sera

après avoir mangé des criquets au Transvaal. Inutile de dire qu'on a eu à déplorer de nombreux cas d'empoisonnement du bétail dans les pays qui ont employé ce procédé. Dans la République Argentine il a été essayé, il y a quelques années, les résultats ont été nuls; il aurait fallu employer des centaines de milliers de tonnes d'acide arsénieux pour obtenir une mortalité appréciable : seulement tout le bétail y serait passé en même temps.

(1) La licence d'emploi du procédé pour la République Argentine avait été offerte moyennant la somme de vingt millions de dollars, soit cent millions de francs; ce qui ne fut d'ailleurs pas accepté.

toujours impossible, mais à réduire le nombre des insectes envahisseurs à un point tel que les dégâts causés puissent être considérés comme négligeables. Ce n'est qu'à l'aide d'un procédé biologique que l'on peut espérer arriver à un tel résultat, et l'agent à mettre en œuvre doit être un ennemi naturel de la sauterelle.

Ennemis naturels de la sauterelle. — Comme il est facile de le prévoir, des insectes se réunissant en bandes innombrables doivent avoir des ennemis nombreux durant toutes les périodes de leur existence.

Des mouches appartenant au genre *Anthrax* et *Idia*, et des coléoptères, les *Milabres*, pondent leurs œufs sur les œufs des acridiens et leurs larves s'en nourrissent.

Des champignons parasites envahissent parfois les lieux de pontes pendant les années humides et malgré le soin qu'ont les sauterelles de toujours choisir des endroits secs. On peut signaler *Isaria destructor* Metchnikoff; *Isaria ophioglossoïdes* Krassil-tchik; M. le professeur Metchnikoff le premier a réalisé la culture en grand des champignons parasites en vue de la production des spores qu'il appliqua à la destruction d'un insecte : *Cleorus punctiventris*, parasite de la betterave en Russie.

Le criquet et la sauterelle adulte sont également pourchassés par un grand nombre d'ennemis : les oiseaux en détruisent une grande quantité, et les migrations de plusieurs espèces sont principalement dues au fait qu'elles se dirigent vers les contrées envahies par les acridiens. Les cigognes d'Europe, par exemple, vont se gaver de sauterelles jusqu'au Transvaal et dans la Colonie du Cap; les cailles vont, dans le même but, dans l'Afrique du Nord, principalement en Egypte. J'ai vu des bandes considérables de mouettes remonter dans l'intérieur des terres à plus de huit cents kilomètres et faire la chasse aux criquets.

De nombreux insectes pondent leurs œufs ou déposent leurs larves sur le corps des criquets et des sauterelles. Les plus importants appartiennent au genre *Sarcophaga*, qu'on rencontre sans exception dans toutes les contrées envahies par les acridiens, et l'on trouve presque toujours dans les bandes de criquets quelques individus porteurs de larves de cette mouche.

Plusieurs champignons parasites des acridiens ont été décrits : *Entomophtora grylli* Fresinius ; *Entomophtora calopteni* Bessey ; *Entomophtora calliphoræ* Giard ; *Lachnidium acridiorum* Giard ; *Mucor exitiosus* Massee.

Enfin un bacille, *Coccobacillus acridiorum*, agent d'une épizootie au Mexique, et que nous étudierons en détail.

L'élevage ou la culture de plusieurs de ces ennemis naturels ont été, à plusieurs reprises, proposés pour lutter contre les acridiens.

En 1867, on tenta l'introduction en Algérie du martin triste de l'Inde (*Acridotheres tristis*), sans résultat : les pauvres Oiseaux moururent avant de s'acclimater.

On a proposé en Algérie l'élevage des *Idia* et en Argentine celui des *Sarcophaga* : inutile de dire que ces propositions émanaient de personnes étrangères à l'entomologie. Une simple réflexion aurait suffi pour convaincre les auteurs de l'impossibilité de tels procédés : il leur aurait suffi de calculer le nombre de mouches à élever pour pouvoir arriver à un commencement de résultat pratique ; ils auraient de plus, pour les *Sarcophaga*, dû savoir que le parasitisme de cette mouche est très étroit, les larves se développant uniquement, non seulement dans le corps de l'acridien vivant, mais encore dans une seule espèce d'acridien : les *sarcophaga* sont des parasites obligés, ce qui rend l'élevage impossible. Acclimater l'espèce où elle fait défaut est inutile ; il est impossible de trouver une région où vivent des acridiens, quelle que soit l'espèce, sans trouver des *Sarcophaga*. Comment se fait-il que ces mouches parasites n'aient pas, je ne dirai pas anéanti les acridiens, mais au moins diminué leur nombre ? C'est qu'à leur tour, elles sont limitées par le parasitisme de diverses espèces de très petites guêpes appartenant au genre *Chalcis*, extrêmement abondantes dans les régions habitées par les *Sarcophaga*.

De nombreux savants ont proposé la culture des champignons parasites de manière à créer des épizooties chez les acridiens : Herbert Osborne en 1883, aux Etats-Unis, avec *Entomophtora Calopteni* Bessey ; M. le professeur Metchnikoff, en Russie, avec *Isaria destructor* Metchnikoff ; Laboulbène et Charles Brongniart, en France, avec *Entomophtora calliphoræ* Giard et *Lachnidium acridiorum* Giard ; W. Cooper

dans la Colonie du Cap, avec *Mucor exitiosus* Massee; ce dernier parasite a été essayé aux Etats-Unis et dans la République Argentine; les résultats ont été nuls. Les champignons ont besoin, pour se développer, de circonstances favorisantes spéciales dont les principales sont la chaleur et l'humidité; une variation de quelques degrés en plus ou en moins empêche le développement: quant à l'humidité, j'ai déjà fait noter avec quel soin les sauterelles évitent les régions humides, qui seraient précisément les seules où l'emploi des champignons aurait des chances de réussite, et elles les évitent certainement pour se mettre à l'abri des épizooties de nature mycosique qui les déciment aussitôt que par hasard elles s'y aventurent. En un mot, si les sauterelles fréquentaient les endroits propices à l'éclosion des mycoses, il serait inutile de provoquer des épizooties, elles se développeraient naturellement d'elles-mêmes.

Restent les épizooties de nature bactérienne : contrairement à ce qui existe pour les champignons, les bactéries vivant à l'intérieur de l'être parasité trouvent toujours un milieu de culture favorable; leur rapide multiplication en fait les facteurs des plus redoutables épizooties, c'est aussi vrai pour les insectes que pour les mammifères.

II

LE COCCOBACILLE DES SAUTERELLES

Origine. — Le coccobacille agent de l'épizootie des sauterelles a été découvert au Mexique, dans l'état du Yucatan. En 1909, une certaine mortalité avait été signalée dans les vols qui arrivent du sud de l'Etat, des confins du Guatemala, région où ils passent l'hiver; l'année suivante, l'épizootie s'était généralisée et sévissait sur un très grand nombre de bandes, enfin, en 1911, les quelques vols qui firent leur apparition étaient tous attaqués et, en 1912, il n'y eut pas d'invasion (1).

(1) F. d'Herelle, Sur une épizootie de nature bactérienne sévissant sur les sauterelles au Mexique. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CLII, p. 1413, 1911.

Dans cette première note, j'indiquais que l'acridien atteint était *Schistocerca pallens*, et cela d'après la nomenclature de *Biologia Centrali Americanae*, pars « Entomology ». Depuis, j'ai eu connaissance de la note déjà

Symptômes. — Les sauterelles atteintes de la maladie naturelle, de même que celles qui sont inoculées ou contaminées expérimentalement *per os*, présentent des symptômes identiques. Après un temps d'incubation (qui varie de une à quarante-huit heures, suivant la virulence du coccobacille, la résistance individuelle de l'insecte, les circonstances cosmiques), on observe que le contenu du ventricule chylifique (qui tient lieu d'estomac) se liquéfie, prend une couleur noirâtre et un aspect assez semblable à celui du sang coagulé. A ce moment, la sauterelle cesse de manger, présente un aspect flasque, elle saute mal et se met à l'abri dans les touffes d'herbe. Le contenu intestinal se liquéfie à son tour; d'abord de couleur jaune clair, il fonce peu à peu jusqu'à prendre une couleur noirâtre; à ce moment une légère pression sur l'abdomen fait sourdre par l'anus une gouttelette de ce liquide, la diarrhée caractéristique se déclare alors, l'insecte souille les feuilles de ses déjections; quelques heures après, la sauterelle tombe sur le côté, les pattes sauteuses sont agitées par intervalle de brusques contractions; cet état comateux se prolonge plus ou moins longtemps, de quelques minutes à quelques heures, puis la mort survient.

Quand la virulence du coccobacille est très exaltée et capable de provoquer la mort en quelques heures, on trouve de nombreuses sauterelles dont le contenu du ventricule chylifique seul présente le noircissement caractéristique : la mort survient avant que le contenu intestinal ait subi une modification.

Après la mort, le cadavre de l'insecte se putréfie très rapidement, les téguments prennent une couleur foncée.

Le contenu intestinal des sauterelles saines est pauvre en bactéries, parfois aseptique. Parmi les saprophytes que l'on rencontre, le plus commun est un coccobacille prenant le Gram, mobile; en l'injectant à dose massive, j'ai pu provoquer la mort des sauterelles, mais j'ai toujours échoué par ingestion. Il communique aux sauterelles une odeur désagréable

citée de M. Kunckel d'Herculais établissant l'unicité de l'espèce *Schistocerca*: les faits que j'ai pu observer sont tous en faveur de la thèse de ce savant: l'acridien sur lequel j'ai observé l'épizootie du Yucatan était, en réalité, *Schistocerca americana* Drury.

qui permettrait de le reconnaître si on l'avait isolé par erreur au lieu du coccobacille spécifique. On trouve parfois des staphylocoques, rarement le subtilis.

Dans le contenu intestinal des sauterelles atteintes de la maladie, on observe une quantité innombrable de coccobacil-

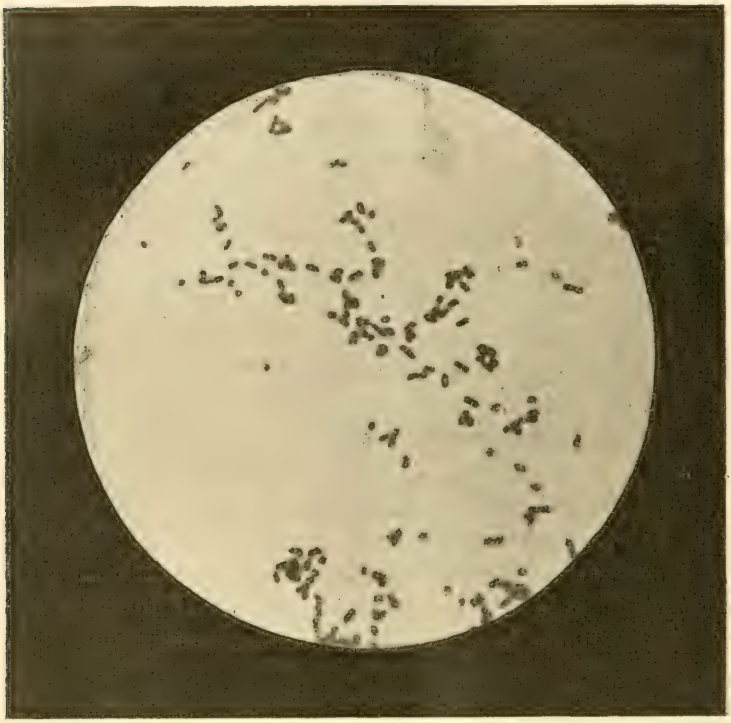


Fig. 2. — *Coccobacillus acridiorum*, contenu intestinal d'une sauterelle morte dans un champ après infection.

les : au microscope, l'aspect est celui d'une culture pure (fig. 2); par isolement, on ne trouve souvent pas un saprophyte pour cent bacilles spécifiques, ce qui rend ces isolements très simples.

En faisant des frottis ou des coupes des diverses parties du corps des sauterelles mortes sous l'action du coccobacille, on constate que tous les tissus sont envahis par le microbe. En même temps qu'une action sur le tube digestif, il se produit

donc une véritable septicémie, le sang fournit une cellule pure.

Caractères du coccobacille (fig. 3). — Le microbe de l'épizootie des sauterelles est un bacille court, légèrement ovoïde, très polymorphe ; dans une même culture, on rencontre des formes

Fig. 3. — *Coccobacillus acridiorum*, culture jeune. (Coloration : 1 seconde au Ziehl.)

coccus de 0,6 μ environ à côté de formes nettement bacillaires de 0,4 μ-0,6 μ par 0,9 μ-1,5 μ. Très mobile, porte des cils sur toute la périphérie. Ne prend pas le Gram et se colore facilement par les couleurs d'aniline.

En culture jeune et dans l'intestin des sauterelles, on ne trouve guère que les formes nettement coccobacillaires : le microbe se colore alors plus fortement aux pôles, surtout si on le colore au Ziehl pur pendant une à deux secondes.

Anaérobie facultatif. Donne des cultures de 16 à 43 degrés dans tous les milieux usuels, même en milieu Raulin. Il se développe très rapidement; à 37 degrés en bouillon, le trouble apparaît dès la quatrième heure. Donne après quelques jours un très léger voile sans éclaircissement du bouillon, qui

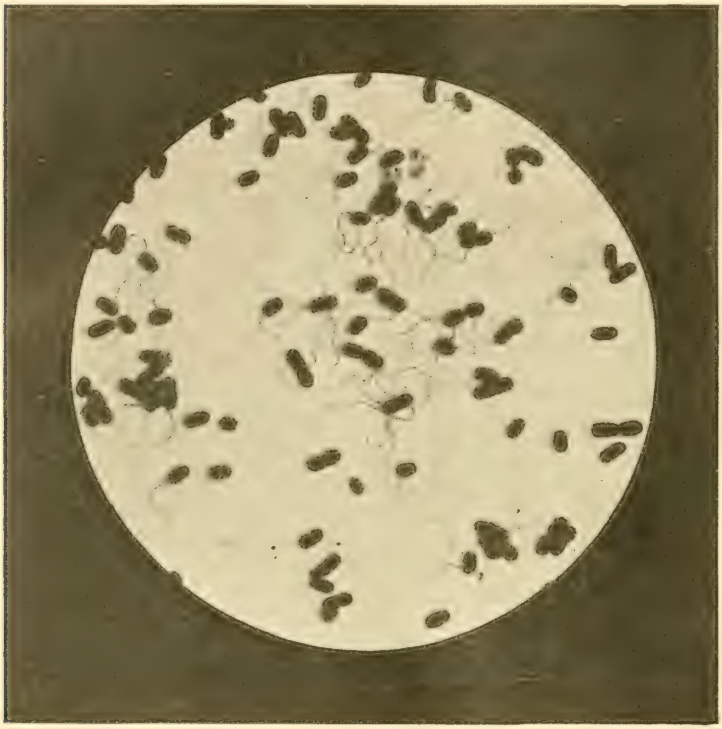


Fig. 4. — *Coccobacillus acridiorium*, cils.
(Coloration; encre de Löffler et Ziehl.)

ne se produit qu'après trois semaines, avec dépôt boueux. Une culture jeune, agitée, produit des ondes soyeuses. L'odeur des cultures rappelle celle du bouillon Liebig concentré.

Sur gélose, les jeunes colonies sont circulaires et ont un aspect cireux. Les colonies sont très visibles après douze heures, après dix-huit elles ont 2 à 3 millimètres de diamètre. En profondeur, petites colonies sphériques, blanchâtres, opaques.

Ne liquéfie pas la gélatine. Coagule le lait, qu'il rend fortement alcalin.

Donne une culture très abondante sur pomme de terre, d'aspect crémeux; la culture dans l'eau de condensation qui se trouve au fond du tube, est tellement dense que le liquide devient sirupeux, à réaction fortement alcaline.

Le coccobacille pousse faiblement dans un bouillon alcalinisé à 2 grammes de soude par litre, normalement avec un demi-gramme. Il végète faiblement dans un bouillon additionné de 1 cent. cube d'acide chlorhydrique par litre (D = 1,180), normalement avec un demi-cent. cube, et dans ce cas il alcalinise peu à peu ce milieu. Dans de vieilles cultures, on trouve une alcalinité telle qu'il faut environ 2 grammes d'acide sulfurique par litre pour la neutralité. Cette alcalinité est due à de l'ammoniaque ; le dégagement est assez fort pour bleuir un papier de tournesol rouge humecté présenté à l'orifice du tube de culture.

Il fermente le glucose, le lévulose, le maltose, le galactose : ensemencé dans un milieu contenant l'un de ces sucres, la réaction du milieu devient rapidement légèrement acide, puis revient en peu de temps à l'alcalinité.

Il ne liquéfie pas la gélatine. Dans la première Note, déjà citée, j'indiquais que la gélatine était liquéfiée après plusieurs jours; j'avais commis une erreur, compréhensible d'ailleurs si l'on pense que j'avais fait cette expérience au Yucatan, l'un des pays les plus chauds du globe.

III

APPLICATION DU COCCOBACILLE DES SAUTERELLES A LA LUTTE CONTRE CET INSECTE

La mortalité considérable observée sur les vols de sauterelles où sévissait l'épizootie au Yucatan, le fait que cette épizootie se propageait rapidement de vol à vol et se continuait jusqu'à extinction totale me donna naturellement l'idée d'essayer de propager cette maladie dans d'autres régions ayant à souffrir du fléau des sauterelles.

Ayant eu connaissance de la Note parue aux *Comptes rendus*, le gouvernement de la République Argentine me chargea d'une mission à l'effet d'étudier l'action du virus sur les saurelles qui envahissaient régulièrement une grande étendue de ce pays, et de tenter la propagation de l'épizootie pour arriver, non pas à détruire l'espèce, ce qui est une impossibilité, mais à réduire le nombre des envahisseurs à un point tel que les dégâts causés fussent insignifiants. Les premières infestations eurent lieu en janvier 1912 et se continuèrent jusqu'en mai ; elles reprirent de décembre à avril 1913. Dans la suite de ce mémoire, je décrirai les études entreprises et les résultats obtenus : ces observations pourront être utiles à ceux qui voudraient employer ce procédé dans d'autres régions. Je passerai successivement en revue les diverses questions qui se posent, en insistant surtout sur le côté pratique, le plus important ici, car on sera le plus souvent appelé à opérer dans des régions désertes, loin de tout centre, avec pour matériel un fil de platine, une lampe à alcool et quelques tubes, ce qui obligera à choisir des méthodes demandant un matériel réduit au strict minimum ; il faudra de plus que ces méthodes permettent d'aller rapidement en besogne, car on est à la merci d'évènements que l'on ne peut modifier ; quand les criquets naissent, il faut être prêt ; quand un vol de sauterelles adultes s'abat, il faut pouvoir l'infester sans retard (le lendemain il sera sans doute parti), et cela avec un microbe dont la virulence est fugace. Tout contribue à créer des difficultés qu'ignorent ceux qui travaillent dans un laboratoire bien pourvu d'instruments et expérimentent à l'heure qu'ils se sont fixée d'avance. Ajouterai-je qu'un bactériologiste qui voudra mener à bien la mission qu'on lui aura confiée ne devra pas ménager ses peines, devra pouvoir endurer la fatigue, passer ses journées à cheval et dormir où le hasard de la poursuite le conduira le soir? S'il n'est pas disposé d'avance à tout faire par lui-même : exaltation et conservation de la virulence, recherche des colonnes et des vols qu'on lui aura signalés, infestations et vérification des résultats, il est inutile qu'il commence, il court à un échec certain : le seul travail bien fait est celui qu'on fait soi-même.

Vitalité et virulence. — La vitalité du coccobacille des sau-

terelles est considérable : en tubes scellés, le microbe a été trouvé vivant après deux ans de conservation à la température ordinaire ; par contre, la virulence baisse très rapidement, et pour obtenir un résultat dans l'application à la destruction des sauterelles, il est absolument indispensable de n'employer pour les infestations que des bacilles exaltés suivant la technique qui sera donnée, sous peine d'un échec certain. Un virus atténué peut immuniser la sauterelle et la rendre réfractaire même pour un coccobacille à son maximum d'exaltation appliqué ensuite.

Exaltation de la virulence. — L'exaltation de la virulence s'obtient par passages successifs par l'organisme de la sauterelle.

Ensemencer le coccobacille en bouillon peptonisé ordinaire. Cultiver à la température ambiante : il faudra avoir soin de ne jamais placer les cultures à l'étuve à cause de la rapide atténuation qui se produit à cette température. Aussitôt que le bouillon présente un trouble manifeste, soit après dix à dix-huit heures, suivant la température ambiante, inoculer une première série de sauterelles avec cette culture.

On peut également ouvrir le tube de gélose où l'on a conservé le virus, y verser 1 ou 2 cent. cubes de bouillon ou d'eau stérile et injecter directement avec ce liquide la première série ; en tous cas, on aura soin de repiquer auparavant sur gélose de manière à parer à toute éventualité, surtout si l'on n'a qu'un seul tube de culture.

A titre d'exemple : le 4 août 1910, au Yucatan, j'isole le coccobacille du contenu intestinal d'une sauterelle atteinte de maladie naturelle ; repiquage le 6 août sur gélose ; second repiquage sur gélose, à Paris, le 4 juin 1911. Le 17 janvier 1913, à Reconquista (République Argentine), j'ouvre le tube, qui avait par conséquent plus de seize mois ; j'émulsionne la couche microbienne dans 2 cent. cubes d'eau et j'injecte de suite, à douze sauterelles, une goutte à chacune. Vingt-deux heures après l'injection, une morte, deux heures après une seconde, une heure plus tard deux autres ; examinées à ce moment, toutes les survivantes présentaient la diarrhée caractéristique et moururent pendant les dix heures qui suivirent. La même émulsion administrée *per os* à douze sauterelles ne produisit

aucun résultat ; si la culture était très vieille, on ferait bien de la rajeunir par un passage en bouillon avant de commencer les injections.

On peut inoculer des sauterelles ou des criquets. Quand il s'agit de *Schistocerca*, le temps d'incubation étant court, on a tout intérêt à se procurer des adultes lors des pontes et à s'en servir pour exalter la virulence et l'entretenir pendant le temps que dure l'incubation : on aura ainsi un virus à son maximum d'exaltation au moment des éclosions. En tous cas, si l'on doit opérer avec des criquets, on aura soin de se procurer les plus gros possible pour faciliter les manipulations, quoique, avec un peu de pratique, on puisse arriver à faire des passages en employant des criquets récemment éclos. Une très fine pipette est alors plus commode que la seringue.

Pour inoculer un criquet ou une sauterelle, saisir l'insecte avec la main gauche, la face ventrale tournée vers l'opérateur, enfoncer l'aiguille de la seringue entre les deuxième et troisième segments antérieurs de l'abdomen, au point d'intersection avec l'un des sillons longitudinaux ; enfoncer l'aiguille horizontalement dans la direction de la tête, comme s'il s'agissait d'une injection hypodermique, à une profondeur de 3 millimètres environ pour un insecte adulte, un peu moins pour un jeune criquet. En tous cas, il faut enfoncer l'aiguille à une profondeur suffisante pour que la goutte soit bien injectée dans la cavité abdominale, et non pas seulement sous le recouvrement de plaque tégumentaire, car l'effet serait naturellement nul, et pas trop profondément, de manière à ne léser aucun organe.

Les aiguilles doivent être très fines et très acérées. On peut également employer une fine pipette coudée.

Injecter une ou deux gouttes de liquide. Inoculer de même une douzaine de sauterelles ou de criquets. Si un ou plusieurs insectes mouraient dans les deux heures qui suivent l'injection, il faudrait les éliminer, car la mort serait due à un traumatisme souffert pendant l'injection : le cas ne se présente jamais quand l'opération est bien faite.

Les symptômes ont déjà été décrits. Aussitôt que les insectes de cette première série sont morts, ou mieux encore agonisants, presser entre les doigts l'abdomen de manière à faire

sourdre par l'anus le liquide noirâtre qui remplit la cavité abdominale que l'on recueille dans un verre de montre. Injecter une goutte de ce liquide dans la cavité abdominale de chacune des douze sauterelles ou criquets qui formeront la série, en suivant la même technique et en observant les mêmes précautions que pour ceux de la première série. Ces insectes mourront dans un laps de temps moindre que les précédents.

Prélever dans un verre de montre le liquide intestinal des trois ou quatre premières mortes de cette seconde série, le diluer avec moitié d'eau et de bouillon stérile, et inoculer, toujours de la même manière, une troisième série.

Faire une quatrième série avec le liquide intestinal des premières mortes de la troisième, dilué au tiers, une cinquième avec le liquide de la quatrième dilué au quart, et continuer de même les séries. Après la onzième série, que l'on inocule avec le liquide intestinal de la dixième dilué au dixième, continuer les séries suivantes, toujours avec du liquide de la série précédente dilué au dixième : il est d'ailleurs exceptionnel que l'on ait besoin de dépasser la douzième série.

On peut considérer la virulence du coccobacille comme suffisamment exaltée quand la mort survient huit heures après l'injection.

Un virus à son maximum d'exaltation injecté à une sauterelle à la dose de 1/100 de cent. cube produit la diarrhée caractéristique en deux heures et la mort une heure plus tard ; cette virulence maximum ne peut être obtenue que difficilement par passage au laboratoire; elle ne s'obtient guère que par isolement du coccobacille du contenu intestinal de sauterelles mortes dans les champs quelques jours après l'infestation des bandes.

J'ai dit plus haut qu'il était rare qu'on soit obligé de faire plus de douze passages pour arriver à une virulence suffisante, du moins quand on s'adresse à un virus ayant déjà été exalté pour l'espèce sur laquelle on veut agir. Lors des premiers essais dans la République Argentine, en janvier 1912, le coccobacille provenant de l'épizootie du Mexique était en culture depuis quatorze mois, et avait subi cinq réensemencements :

la virulence a été suffisamment exaltée après onze passages, qui demandèrent cinq jours. Lors des infestations dans la province de La Rioja, en avril de la même année, les cultures n'étaient pas passées par sauterelles depuis deux mois et avaient subi trois réensemencements; quatre passages ont suffi. En décembre 1912, pour infester la région de Rafaéla, les cultures provenaient de sauterelles mortes à La Rioja; elles avaient sept mois de cultures et trois réensemencements; il a fallu six passages pour obtenir une virulence satisfaisante.

Quand l'acridien que l'on veut contaminer est d'une espèce différente de celle pour laquelle le coccobacille a été précédemment exalté, un grand nombre de passages peuvent être nécessaires, et j'attire spécialement l'attention des expérimentateurs sur ce fait. En Algérie, le Dr Sergent, en partant du coccobacille primitif de l'épizootie du Yucatan que je lui avais envoyé, dut pratiquer cinquante-deux passages par *Stauronautus maroccanus* pour arriver à tuer en huit heures : par contre, à Chypre, également pour *Stauronautus maroccanus*, M. W. Francis obtint une virulence suffisante après douze passages.

Quand on aura à expérimenter sur une espèce nouvelle, il sera utile de faire les premières inoculations sur un grand nombre de criquets ou de sauterelles, on aura ainsi plus de chances de trouver des insectes qui, pour une cause quelconque, seront plus sensibles que les autres. On pourrait aussi prendre, pour les premiers passages, des insectes affaiblis par un jeûne de quelques jours, de manière à réduire leur résistance naturelle. Tant que l'on n'aura pas atteint une virulence capable de tuer en une quinzaine d'heures, on ne devra pas diluer le contenu intestinal pour faire les injections, mais l'employer pur.

Un virus exalté pour une espèce de sauterelle ne l'est pas pour une autre : par exemple, une exaltation maxima pour *Schistocerca americana* ne l'est pas pour *Caloptenus* sp.? du sud de la République Argentine et *vice versa*. A titre d'exemple, je citerai l'expérience suivante : un coccobacille tuant, par injection de 1/20 de cent. cube, un criquet de *Schistocerca* en huit heures, ne produisait la mort de *Caloptenus* à la même dose qu'en vingt-huit heures; après plusieurs passages par

ce dernier insecte, il parvenait à le tuer en quatre heures par injection et en neuf heures *per os*. Reporté sur *Schistocerca*, il ne provoquait la mort qu'en vingt heures par injection et ne tuait plus *per os*; il fallut plusieurs passages pour lui faire récupérer sa virulence primitive pour cette espèce (1).

Les bactériologistes chargés des infestations d'une espèce nouvelle d'acridiens ne doivent donc pas se décourager quand la mort des insectes traîne en longueur lors des premiers passages, ils n'ont qu'à continuer et se souvenir des cinquante-deux passages qui ont été nécessaires pour obtenir une virulence suffisante pour *Stauronautus maroccanus* en Algérie.

Une modification a été apportée à la technique que je viens de décrire par le Dr Sergent (2), en Algérie, et en même temps par le Dr Zea Urribe, en Colombie : entre chaque passage par sauterelle ils intercalent une culture en bouillon du contenu intestinal : la première série est infectée avec une culture en bouillon : avec une anse du contenu intestinal de la première sauterelle morte, on ensemence un tube de bouillon et de gélose ; quand la culture est suffisamment développée, on s'en sert pour injecter une seconde série de sauterelles, et ainsi de suite. On pourrait essayer cette méthode d'exaltation (assez semblable d'ailleurs à celle qui a été proposée par Haffkine pour le vibrion cholérique) si on éprouvait quelques difficultés en se servant du procédé que j'ai indiqué; je ne crois pourtant pas cette modification nécessaire, car le Dr Harris, à Chypre, opérant sur *Stauronautus maroccanus* tout comme le Dr Sergent, en Algérie, a pu exalter convenablement la virulence par douze passages simples; en Colombie, le Dr Lleras me paraît également avoir obtenu un virus plutôt plus actif que celui du Dr Zea Urribe, quoiqu'il n'ait employé que la méthode des passages simples. Somme toute, la modification présentera peut-être des avantages dans certaines conditions.

Quand la virulence est suffisamment exaltée, prélever de la première sauterelle agonisante de la dernière série une trace

(1) Il résulte de tout ceci que, la virulence ayant été rapidement exaltée pour le *Schistocerca* de la République Argentine, le *Schistocerca* du Mexique d'où provenait le coccobacille devait être de la même espèce, ce qui est un argument de plus en faveur de l'unicité de l'espèce.

(2) [Voir, dans les *Annales* d'avril 1914, le Mémoire du Dr Sergent.]

du contenu intestinal au moyen d'un fil de platine, et faire un isolement sur gélose inclinée, ou, si l'on préfère, en boîte de Petri. Cultiver à la température de la chambre. Après vingt-quatre, trente-six heures, les colonies sont suffisamment développées pour pouvoir être soit repiquées sur gélose, si l'on veut simplement conserver le virus, soit ensemencées directement en bouillon qui servira aux infestations.

Ensemencements des bouillons. — Le bactériologiste devra toujours avoir présent à la mémoire que la virulence du coccobacille baisse très rapidement en culture, et s'atténue également d'une façon très sensible par repiquage; pour ces raisons, il est absolument indispensable d'ensemencer les bouillons destinés aux infestations avec un coccobacille :

1° Qui a subi le moins de repiquages possibles. Ce résultat est obtenu en prélevant la semence directement sur les tubes ayant servi à faire l'isolement, ou sur les boîtes de Petri, si on a choisi ce moyen pratique, vu les conditions où on est appelé à opérer ;

2° Qui vient de sortir de l'organisme de la sauterelle. Comme la campagne d'infestation peut durer plusieurs mois, si les régions envahies sont étendues, il faut continuer la série des passages pendant toute la durée de la campagne, de manière à avoir toujours sous la main un virus au maximum d'exaltation et ne pas être forcé d'employer une semence depuis plusieurs jours en culture.

J'indiquerai plus loin une autre méthode d'obtention d'un virus exalté au cours d'une campagne.

Je recommande tout spécialement aux bactériologistes chargés des infestations de ne jamais commencer avec un coccobacille insuffisamment exalté; il vaut mieux se donner la peine de faire deux ou trois passages de trop que de n'en pas faire assez; dans le premier cas, ce n'est qu'un retard de un ou deux jours; dans le second, c'est le résultat de toute une campagne qui peut se trouver compromis.

Il est inutile de dire que les bouteilles de bouillon devront être ensemencées purement, ce qui n'est pas facile avec des récipients munis de fermeture mécanique; on y arrive pourtant avec un peu de pratique. Quand on ouvre la bouteille pour faire les pulvérisations, on reconnaît de suite si la culture

est pure ; l'odeur ne doit rien avoir de désagréable, comme je l'ai dit aux caractères de culture. Tout récipient dont le contenu est putride doit être rejeté.

Infestations. — Le matériel nécessaire pour pratiquer les infestations se compose de pulvérisateurs et de bouillons de culture.

Le pulvérisateur est du même type que ceux qui s'emploient pour pulvériser les solutions anticryptogamiques sur les vignes et les arbres fruitiers. N'importe quelle marque convient ; j'ai employé le plus petit modèle de Vermorel, qui m'a donné satisfaction ; il serait pourtant préférable de posséder un appareil étamé intérieurement.

Il faudra bien s'assurer, au cas où le pulvérisateur ne serait pas neuf, qu'il n'ait pas contenu auparavant des solutions antiseptiques, comme le sont tous les liquides employés pour lutter contre les maladies de la vigne et des arbres fruitiers ; un tel appareil ne peut servir et doit être rejeté, ou, s'il est absolument impossible de s'en procurer un autre, devra être lavé à plusieurs reprises avec de l'eau bouillante ; et malgré des lavages répétés, il sera très difficile de le nettoyer complètement, vu les aspérités intérieures, les clapets, les robinets où les substances antiseptiques se sont desséchées.

Bouillons de culture. — La question des bouillons de culture est plus compliquée.

Théoriquement, il suffirait de quelques centimètres cubes de culture pour infester quelques sauterelles, ces insectes en contamineraient d'autres et l'épizootie suivrait son cours par contagion naturelle ; seulement, en opérant dans ces conditions, la disparition des insectes serait très longue et, de plus, on aurait de grandes chances de courir à un échec, l'épizootie pouvant s'éteindre par suite d'une foule de circonstances qu'il serait trop long d'énumérer, mais qu'un bactériologiste peut aisément prévoir. Pratiquement, il faut infester le plus grand nombre de sauterelles possible dans le plus grand nombre de bandes possible, de manière à exterminer ces insectes dans un laps de temps aussi court que possible et avec alors toute certitude que l'épizootie ne s'éteindra pas ; pour cela, il faudra employer une grande quantité de bouillon, et le problème du ravitaillement se pose.

Deux cas peuvent se présenter :

1° La région à infester se trouve à proximité d'une ligne de chemin de fer. Le bouillon se fabrique, dans ce cas, dans un laboratoire central et est envoyé là où le besoin s'en fait sentir.

Dans le commencement, le bouillon employé était le bouillon de viande peptonisé ordinaire. Ce milieu présentait un gros inconvénient, la virulence baissait rapidement, et il fallait l'utiliser dans les deux ou trois jours qui suivaient l'ensemencement. Pour remédier à ce défaut, j'ai poursuivi une série de recherches qui m'ont conduit à trouver un milieu où la virulence se conserve au moins pendant une quinzaine de jours, ce qui permet de l'envoyer déjà ensemencé sur les lieux où son emploi est nécessaire. Ce milieu, qui est préférable chaque fois qu'on pourra l'expédier d'un laboratoire, se compose de :

Eau	1.000
Peptone Chapoteau	40
Sel ordinaire	5
Gélatine	30
Glucose	5

Faire bouillir, alcaliniser légèrement, filtrer, répartir dans les bouteilles, couvrir le col et le bouchon avec un tampon de coton cardé recouvert d'un capuchon de papier parcheminé et stériliser à 120 degrés pendant une demi-heure.

La composition de ce milieu m'a été suggérée par le travail de M. Truche sur la conservation de la virulence du pneumocoque. Outre la conservation plus longue de la virulence, il offre l'avantage, grâce à sa teneur en gélatine, de se fixer plus facilement sur les herbes après pulvérisation, et grâce au glucose, les plantes arrosées sont de suite dévorées par les sauterelles, qui sont friandes de sucre.

Vers la fin de la dernière campagne en Argentine, j'ai essayé le milieu suivant :

Eau	1.000
Pommes de terre râpées	10
Peptone	5
Sel ordinaire	5
Gélatine	20
Glucose	5

Faire bouillir, alcaliniser légèrement, filtrer.

Le microbe se développe très abondamment dans ce milieu. Au laboratoire, la virulence était conservée après quinze jours. Comme il n'y avait plus de criquets, je n'ai pu vérifier si les résultats étaient bons dans la pratique.

2° Les régions envahies se trouvent à des distances telles d'une voie de communication qu'il est pratiquement impossible de recevoir le bouillon d'un laboratoire central ; dans ce cas il faut le fabriquer sur place au moyen d'appareils simples et facilement transportables ; nous reviendrons sur ce point dans le chapitre qui aura trait à l'organisation pratique de la lutte.

Infestations. — Les bouteilles de bouillon ensemencées purement peuvent s'employer aussitôt que le trouble est manifeste. La culture doit toujours avoir lieu à la température ambiante, jamais à l'étuve. Le bouillon est versé dans le pulvérisateur au moment même de l'emploi. La quantité de bouillon à pulvériser varie avec l'étendue de la tache de criquets ou du vol de sauterelles : 1 litre par hectare de superficie suffit quand il s'agit de petites taches de quelques hectares ; pour les grandes taches, on pourra réduire considérablement, surtout si l'on a soin de disséminer judicieusement les foyers sur toute l'étendue, comme je l'indiquerai plus loin : par exemple, pour une tache de 100 à 200 hectares, il suffira de pulvériser en une vingtaine d'endroits différents un demi-litre chaque fois, soit en tout 10 litres. Quand il s'agit de vols qui retournent à la fin de l'été, comme on n'a pas d'intérêt, au contraire, à l'anéantir le plus vite possible, on peut réduire encore ; 1 ou 2 litres suffisent alors pour contaminer, l'épizootie se propagera ensuite peu à peu et les vols infestés la propageront au loin. En tout cas, il est certain que plus on répandra de bouillon de culture, plus la maladie s'étendra rapidement ; toutefois, à moins que l'on n'ait des raisons spéciales pour que l'épizootie atteigne rapidement tous les criquets, la quantité indiquée est suffisante. Au lieu de tout répandre dans un seul endroit forcément restreint, il est de beaucoup préférable de disséminer les foyers en pulvérisant le liquide de place en place, en choisissant les endroits où les criquets sont en plus grande quantité, et surtout en train de manger ; comme ces insectes s'infectent en mangeant les herbes souillées, on com-

prend qu'il y a tout intérêt à arroser de préférence les touffes d'herbes ou les plantes couvertes de criquets; on ne pourrait espérer obtenir de résultats favorables en pulvérisant, par exemple, une bande de ces insectes en marche sur un terrain nu. La manière de répandre le liquide importe beaucoup plus que la quantité répandue : 10 litres pulvérisés au même endroit ne produiront pas autant d'effet que 1 seul litre pulvérisé par petites fractions sur toute l'étendue de la tache; le résultat final sera le même, mais la destruction totale se produira dans un laps de temps plus considérable dans le premier cas que dans le second.

Les pulvérisations peuvent avoir lieu le matin de très bonne heure, ou le soir vers le coucher du soleil, ce dernier moment étant de beaucoup le plus favorable. La chaleur et surtout la grande lumière du jour atténuerait rapidement la virulence du bacille pulvérisé sur des plantes, à midi, en plein soleil. Dans les déjections, la virulence et la vitalité du coccobacille se maintiennent beaucoup plus longtemps qu'en bouillon. De cadavres desséchés et conservés sept mois au laboratoire, j'ai isolé des coccobacilles tuant par injection en six heures, c'est-à-dire très virulents.

Si, par suite de circonstances spéciales, on était obligé de faire des pulvérisations au milieu du jour, on devrait choisir des points à l'ombre sous des broussailles, en un mot agir de telle sorte que le virus subisse le moins possible l'atteinte de la lumière et de la chaleur.

Les infestations peuvent se pratiquer sur les criquets ou sur les sauterelles ailées adultes. Pendant les premiers jours de leur existence, les criquets jouissent d'une grande résistance à la maladie; cette résistance va en s'atténuant peu à peu et, douze à quinze jours après l'éclosion, elle est suffisamment réduite pour que la maladie se propage de suite après les infestations.

Toute bande infestée est condamnée à disparaître. Si l'infestation a lieu pendant les derniers jours de la vie larvaire, l'épizootie n'aura pas le temps de détruire toute la bande avant la dernière mue, les survivants s'envoleront, transportant avec eux les germes de la maladie et mourront peu à peu.

Modes de contagion. — Nous avons dit qu'il était inutile de répandre, en général, plus de 1 litre de culture par hectare; les insectes qui mangent les herbes souillées contractent la maladie, la diarrhée se déclare après un temps d'incubation plus ou moins long, le plus souvent quelques heures, parfois quelques jours; les déjections liquides se répandent sur les herbes, les sauterelles qui mangent ces herbes s'infectent et contaminent à leur tour de nouvelles plantes, et le cycle se continue jusqu'à disparition de la tache ou du vol. L'épizootie commence donc plus ou moins lentement, suivant les conditions favorisantes ou empêchantes que nous examinerons, augmente d'intensité, atteint son maximum du cinquième au trentième jour, puis décroît brusquement, les derniers survivants exigeant un temps relativement long pour s'infester, parce qu'ils sont plus clairsemés, la contagion étant donc plus difficile à réaliser.

Pour les *Schistocerca*, il existe un autre mode de contagion très important : les criquets et même parfois les adultes se mangent entre eux; aussitôt que l'un de ses congénères faiblit il est dévoré; ce mode de contagion peut devenir primordial dans des régions où la végétation est pauvre et où les sauterelles trouvent difficilement leur nourriture. On comprend que l'épizootie se développera plus lentement chez les espèces qui ne pratiquent pas l'acridophagie : *Stauronautus* et *Caloptenus* par exemple.

Pour *Schistocerca*, si les circonstances sont les plus favorables, une bande de criquets peut être complètement détruite en huit jours, comme j'ai observé le fait dans la province de La Rogia, en avril 1912; si ces circonstances sont moins favorables, l'épizootie traîne en longueur, tuant seulement un petit nombre de sauterelles par jour, jusqu'au moment où, une circonstance favorisante survenant, la maladie se répand brusquement; c'est ce qui s'est passé dans la région de Rafaela en décembre 1912 : pendant les vingt jours qui suivirent les infestations, la maladie se propagea lentement, tuant chaque jour un petit nombre d'insectes, puis augmenta peu à peu d'intensité; au vingt-cinquième jour, l'épizootie était à son apogée dans un rayon d'une dizaine de kilomètres autour de chaque foyer d'infestation.

Les principaux facteurs qui influent sur la marche de l'épizootie sont :

1° La température ambiante, importante dans le cas des insectes dont la température interne est à peu près celle du milieu extérieur. Nous avons vu que le coccobacille se reproduit de 16 à 43 degrés, l'épizootie peut donc se propager entre ces températures limites : mais plus on se rapprochera de la température optima, c'est-à-dire dans les environs de 28 à 30 degrés, plus la marche de la maladie sera rapide.

2° La période de la vie de l'insecte : criquet ou sauterelle adulte, et pour chacune de ces périodes, l'âge. Les criquets sont continuellement en contact avec les herbes, marchent en colonnes très denses, pressés les uns contre les autres, sont doués d'un appétit vorace, subissent dans le court intervalle de leur vie larvaire, cinq mues, qui sont autant de périodes de moindre résistance ; les sauterelles ailées, au contraire, passent une bonne partie de leur vie dans l'air, ne sont que rarement pressées les unes contre les autres et seulement quand le temps est froid : elles mangent beaucoup moins que les larves : l'épizootie aura bien plus de tendance à se généraliser parmi les bandes de criquets que sur les vols de sauterelles adultes qui pourtant, individuellement, sont plutôt moins résistantes que les criquets. L'âge influe également : les jeunes criquets ou mouches jouissent d'une résistance maxima, qui va s'atténuant peu à peu et arrive à être minima vers l'époque de la dernière mue ; pour la sauterelle adulte, l'époque de la ponte est un moment de moindre résistance.

3° La plus ou moins grande abondance de nourriture, qui fait que l'insecte est plus ou moins résistant. J'ai déjà signalé que le manque de nourriture incite les criquets de *Schistocerca* à l'acridophagie, circonstance éminemment favorisante.

4° La densité des vols ou des bandes ; plus la tache ou le vol est compact, plus l'épizootie aura de chances de se répandre rapidement. Si les sauterelles sont très dispersées, comme cela arrive pour certaines espèces, l'épizootie pourra durer des mois.

Une très forte pluie peut paralyser pendant quelques jours la marche d'une épizootie : la pluie lave les herbes souillées par les déjections, empêchant par conséquent ce mode de

contagion : l'épizootie reprend ensuite peu à peu son cours normal. J'ai observé, au contraire, qu'une pluie de peu de durée était plutôt une circonstance favorisante.

Un fait assez curieux se passe quand une bande de criquets infestées rencontre sur sa route une rivière : on trouve sur la rive un véritable amoncellement de cadavres, sur la seconde rive également de nombreux cadavres, mais en nombre pourtant moindre, puis plus rien : l'épizootie semble s'arrêter complètement; elle ne recommence qu'après quelques jours et reprend alors son cours normal. Que s'est-il passé? Il est aisé de le comprendre : tous les criquets déjà fort atteints ne peuvent fournir l'effort nécessaire et meurent sans pouvoir franchir l'obstacle ; ceux qui n'étaient que faiblement atteints peuvent passer, mais affaiblis par l'effort, meurent sur la rive opposée, la colonne qui poursuit sa marche est alors composée uniquement de sujets sains et des quelques criquets dont l'infection commence à peine, l'épizootie subit donc un temps d'arrêt.

Pour toutes les raisons qui viennent d'être exposées, il est impossible de fixer, pour tous les cas qui peuvent se présenter et pour toutes les espèces de sauterelles, un laps de temps à la durée d'une épizootie; dans chaque bande, dans chaque vol, la marche en est réglée par des circonstances qui varient dans chaque cas et empêchent de fixer une règle générale, ce sera parfois une question de quelques jours, le plus souvent de quelques semaines : trois ou quatre ; rarement de quelques mois. La durée de l'épizootie est d'ailleurs de peu d'importance, le but n'est pas et ne peut être de tuer pour protéger des cultures ; un virus n'est pas un poison foudroyant, mais l'objectif doit être d'arriver en deux, trois ou quatre ans, à réduire tellement le nombre des sauterelles que ces insectes cessent d'être un fléau. Si l'épizootie se propageait assez rapidement pour tuer dans tous les cas les bandes entières en cinq ou six jours, comme cela arrive parfois, la propagation de l'épizootie à distance et sa conservation d'une année à l'autre ne seraient pas possibles.

Propagation de la maladie à distance. — On devra toujours avoir soin d'infester les vols de sauterelles ailées que l'on aura l'occasion de rencontrer, pour assurer la propagation à distance

de l'épizootie, grâce aux longs parcours faits par les vols en peu de temps et à leurs fréquents déplacements. En février 1912, j'ai isolé le coccobacille de cadavres de sauterelles mortes dans la province de Cordoba, à environ trois cents kilomètres du point infesté le plus proche une quinzaine de jours auparavant. Des vols infestés en octobre 1912 près de Reconquista sont allés mourir une quinzaine de jours plus tard de l'autre côté du Panama, à une centaine de kilomètres. A la même époque, un vol infesté près de Palacios (Santa Fé), meurt dix jours après, près de Esperanza, à une quarantaine de kilomètres. Un vol important est infesté près de Reconquista, fin janvier, son passage est signalé près de Rafaela le 27 février; le 6 mars, il se pose près de Recreo, où il reste trois jours : quand il reprend son vol, il laisse des quantités de cadavres et de malades sur les lieux, d'où l'on isole le coccobacille; la distance entre Recreo et Reconquista est, à vol d'oiseau, de 550 kilomètres.

La biologie de l'acridien considéré a une grande importance pour la propagation à distance; plus l'insecte est voyageur, plus cette propagation a lieu rapidement. Les *Schistocerca*, qui se déplacent en quelques jours de plusieurs centaines de kilomètres, sont ceux qui propagent l'épizootie en un minimum de temps; avec les *Stauronautus*, la dissémination sera plus lente quoique encore assez rapide; avec certaines espèces locales, comme *Caloptenus* sp., du sud de la République Argentine, qui meurent à quelques kilomètres du point où elles sont nées, cette dissémination ne se fera que très lentement. Comme conséquence pratique, plus une espèce est sédentaire, plus il faut multiplier les foyers d'infestation.

Conservation d'une année à l'autre. — Comme nous l'avons vu, les jeunes sauterelles, par suite de leur mode de vie, s'infectent plus difficilement que les criquets et le cours de l'épizootie est très lent dans les vols : il peut se passer parfois plusieurs mois avant que la dernière sauterelle périsse.

On pourrait objecter à cela qu'on a observé, principalement en décembre 1912 dans la région de Rafaela, une propagation extrêmement rapide de l'épizootie sur de jeunes sauterelles, à tel point que tous les vols qui se trouvaient dans la région ont

été entièrement détruits en quelques jours (1); le cas est spécial, car il s'agissait de bandes qui avaient été infestées à l'état de criquets avant la dernière mue, l'épizootie s'était propagée d'abord sur ces criquets; est survenue la dernière mue, qui les a placés dans un état de moindre résistance, causant une mortalité très élevée, et les criquets qui ont pu accomplir leur dernière mue étaient déjà en grande partie contaminés quand ils sont arrivés à l'état adulte; cela ne prouve pas que la sauterelle soit plus sensible que le criquet et que l'épizootie se propage plus rapidement sur les vols que sur les bandes, mais simplement que la mue est une période critique, comme il fallait d'ailleurs s'y attendre (2); les choses ne se passent pas de même quand on infeste des insectes déjà arrivés à l'état adulte; quand les infestations ont lieu sur de vieilles sauterelles arrivant du Nord, l'épizootie peut alors être très rapide, car la sensibilité de ces vieilles sauterelles paraît être très grande, et de plus elles ne volent plus en ordre dispersé comme les jeunes qui vont au Nord, mais en vols très compacts, ce qui favorise la contamination.

Au Yucatan, l'épizootie a commencé en 1908 à sévir sur quelques bandes; lors de l'invasion de 1909, un grand nombre de bandes étaient contaminées et, en 1910, l'épizootie était généralisée : seule la sauterelle ailée avait pu conserver le virus d'une année à l'autre.

Dans la République Argentine, le même fait s'est passé en 1912. Le premier vol d'invasion a été constitué par un vol provenant des provinces du Nord et s'est abattu en septembre 1912 sur les environs de Rio Quarto; en novembre, j'ai trouvé

(1) Rapport des inspecteurs Tribodi et Barbesino au ministère de l'Agriculture de la République Argentine, décembre et janvier 1912 et 1913.

(2) M. Kunckel d'Herculais, dans une Note à l'Académie des Sciences (*Comptes rendus*, 6 mars 1899), considère la mue chez les insectes comme un moyen de défense contre les parasites végétaux ou animaux; cela est très vrai en ce qui concerne les champignons dont les spores se fixent sur les téguments et sont expulsées lors de la mue avant d'avoir eu le temps de germer, ainsi que pour les parasites animaux du tube digestif expulsés lors de la mue trachéale et intestinale; la mue ne sert par contre à rien à l'insecte quand il est attaqué de la maladie causée par le coccobacille qui, outre l'affection intestinale, cause une septicémie généralisée à tous les organes. La mue, protection pour l'insecte contre les mycoses et les parasites animaux, est une cause de moindre résistance dans le cas des maladies bactériennes causant une septicémie.

de vieilles sauterelles mortes et malades et j'ai isolé le coccobacille du liquide de diarrhée. En janvier 1913, une forte épizootie fut signalée dans ces régions, sévissant sur les criquets nés des pontes laissées par ces sauterelles de l'invasion de septembre; comme, intentionnellement, aucune infestation n'avait eu lieu dans la contrée, il faut bien admettre que le virus provenait des infestations de l'année précédente (1).

Comment se conserve le virus pendant l'incubation? De trois manières différentes.

Une bande de sauterelles dans laquelle sévit la maladie laisse des cadavres sur les lieux de ponte; j'en ai trouvé précisément à Sampacho, dans le département de Rio Quarto; le microbe se maintient très longtemps virulent dans les cadavres, comme je l'ai indiqué, il est donc présent dans les champs au moment de l'éclosion des jeunes criquets.

Au moment de la ponte, si la femelle, ou même le mâle, est atteint, les œufs seront forcément souillés par le liquide de diarrhée, et le coccobacille se conservera jusqu'au moment de l'éclosion sur les œufs et dans la matière mucilagineuse sécrétée par la sauterelle pour protéger sa ponte.

Les porteurs de germes doivent entrer pour beaucoup dans la conservation du virus d'une année à l'autre, ainsi que pour la propagation à distance de l'épizootie; dès ma première note, j'ai en effet signalé que des sauterelles ramassées dans les bandes malades au Yucatan présentaient dans leur intestin le coccobacille spécifique virulent, quoique ces sauterelles ne présentassent aucun symptôme de la maladie. J'ai, depuis, constaté le même fait en Argentine dans les bandes contaminées, mais, malgré de nombreuses recherches, je n'ai jamais trouvé

(1) Inutile de dire que jamais on n'avait signalé dans la République Argentine d'épizooties sévissant chez les sauterelles avant les infestations de janvier 1912, et pourtant depuis plus de vingt ans la lutte contre la sauterelle était menée scientifiquement d'une manière très active. Un laboratoire spécial avait été fondé dès 1898 pour l'étude spéciale de la biologie et de la pathologie de la sauterelle (M. Kunckel d'Herculais, assistant au Muséum d'Histoire naturelle de Paris, l'avait fondé et dirigé pendant trois ans), tous les parasites y ont été successivement étudiés, plus de deux mille employés de la « Défense agricole », qui relève du Ministère de l'Agriculture, ont chaque année parcouru le pays en tout sens, ayant comme unique mission d'observer la sauterelle ; c'est dire qu'une épizootie n'aurait pu passer inaperçue.

de criquets présentant cette particularité, qui semble propre à la sauterelle adulte.

Appréciation des résultats. — Pour apprécier la marche d'une épizootie, il faut avoir présentes à l'esprit les circonstances suivantes.

Les criquets se mangent entre eux, du moins dans le genre *Schistocerca*, c'est-à-dire qu'il ne faudra espérer trouver des cadavres en grand nombre que si l'épizootie est à son apogée ; de plus, les oiseaux et surtout les autres insectes, fourmis, en particulier, font rapidement disparaître la grande majorité des cadavres.

Quand une bande est en mouvement, il faudra se rappeler que les cadavres se disséminent sur tout le parcours. Supposons une bande de criquets compacte, soit mille insectes au mètre carré; supposons en outre que, les circonstances étant les plus favorables possible, l'épizootie ne dure que dix jours, au bout desquels il ne reste plus un seul insecte vivant, et, finalement, que pendant ce laps de temps, la bande parcourt dix kilomètres, et sans s'étendre ; comme on le voit, on trouvera rarement des conditions plus favorables et on pourrait s'attendre à trouver de nombreux cadavres. Eh bien, il n'y a qu'à effectuer un petit calcul pour voir qu'on ne trouvera sur le parcours qu'un seul cadavre par dix mètres carrés, et en supposant, ce qui ne sera jamais le cas, qu'aucun ne soit jamais mangé. Un cadavre par dix mètres carrés, c'est dire qu'il faudra chercher bien attentivement pour arriver à trouver quelques rares sauterelles mortes. Que l'on réduise si l'on veut le parcours, que l'on suppose que la tache de criquets ne parcourut qu'un seul kilomètre en dix jours, ce qui s'est rarement vu, on ne trouvera encore qu'un seul cadavre par mètre carré, et un observateur non préparé affirmera que l'épizootie ne s'est pas développée, et pourtant tout sera mort et dans des conditions idéales pour qu'on trouvât facilement les cadavres. On comprend aisément que, dans la pratique, où l'épizootie dure souvent presque un mois, pendant lequel la bande parcourt plusieurs kilomètres en s'éparpillant, se fractionnant, chaque fraction se réunissant bientôt à des fractions d'autres bandes, où une grande partie des cadavres sont dévorés par les mêmes criquets, par les oiseaux et les insectes, il devient pour ainsi dire impossible de

trouver des morts. On m'objectera peut-être que, ne retrouvant plus la tache, on pourra toujours conclure à sa destruction : c'est une erreur, car celui qui sera chargé de cette recherche admettra, *a priori*, que, ne retrouvant pas de morts, les criquets doivent être encore en vie et que la bande doit s'être cachée dans un endroit ou un autre, à moins que, à deux ou trois lieues à la ronde, il ne trouve une autre bande, auquel cas il affirmera que c'est celle qui a été infestée (1).

Tout ce que je viens de dire s'applique surtout à *Schistocerca*; pour les criquets d'espèces parcourant des distances plus réduites, ne se mangeant pas entre eux, on peut retrouver alors de nombreux cadavres, comme cela est arrivé lors des infestations en Algérie et à Chypre avec *Stauronautus maroccanus* et dans le sud de l'Argentine avec *Caloptenus*.

Vérification de la marche de l'épizootie. — L'unique moyen de se rendre compte de la marche de l'épizootie et du degré d'infestation des bandes consiste à recueillir une centaine de sauterelles ou de criquets vivants et de voir combien présentent la diarrhée caractéristique; tout insecte qui montrera par légère compression sur l'abdomen la gouttelette liquide sortant de l'anus est atteint et destiné à mourir dans les vingt-quatre heures. Si, par exemple, cinq jours après les infestations, on trouve que quatre sauterelles sur cent ont la diarrhée, on peut être certain que le lendemain ces quatre insectes seront morts; supposons que le lendemain six sauterelles sur cent présentent la goutte liquide, on saura que l'épizootie augmente d'intensité; enfin si le jour suivant on observe le même symptôme chez seize insectes sur cent, on saura que le lendemain vingt-six pour cent de la bande auront été détruits, et ainsi de suite; en un mot, on connaîtra à chaque instant l'état sanitaire de la tache, la mortalité des vingt-quatre heures suivantes, et, en addition-

(1) Pour montrer avec quel soin il faut se méfier des fausses interprétations des résultats, je citerai le cas suivant, qui est typique. En octobre 1912, le directeur de l'Agriculture de la République Argentine charge un ingénieur agronome d'infester près de Reconquista un vol de vieilles sauterelles qui vient d'arriver du Nord; cet employé remplit sa mission et avise que l'infestation n'a donné aucun résultat. Quelque temps après, me trouvant dans cette région, je m'informe, et j'apprends que le vol, posé sur des arbres, a été infesté le soir entre six et sept heures, et que toutes les sauterelles ont repris leur route le lendemain matin au lever du soleil! Il n'était réellement pas étonnant qu'en une dizaine d'heures on n'ait pu observer aucun résultat.

nant, la mortalité depuis l'infestation. On pourrait également capturer cent criquets ou sauterelles en vie, les mettre en cage et compter les morts qui surviennent dans les trois jours; dans le premier cas, on ne tient compte que des insectes déjà atteints de diarrhée, dans le second, de toutes celles qui se sont infestées.

On devra avoir soin de recueillir les cent sauterelles ou criquets, non pas à la même place, mais une d'un côté, l'autre de l'autre, sur tout l'espace occupé par la bande ou le vol, de manière à obtenir une moyenne se rapprochant le plus possible de la réalité, car l'infection sera également répartie sur toute l'étendue occupée par ces insectes, mais sévira avec plus d'intensité sur un point que sur un autre; en prélevant toutes les sauterelles à la même place, on risquerait fort de se tromper en plus ou en moins.

Ce procédé est le seul qui puisse donner des renseignements sûrs et précis. On pourrait faire suivre, bien entendu, la tache jour et nuit, jusqu'à son extermination complète, ce qui est parfaitement possible pour un essai, mais impossible dans la pratique courante des infestations.

Coccobacille à son maximum d'exaltation. — J'ai indiqué une méthode d'exaltation de la virulence du coccobacille au laboratoire; c'est la seule méthode applicable au commencement d'une campagne, mais quand les infestations ont été commencées, il est de beaucoup préférable de ramasser dans les bandes où sévit l'épizootie des sauterelles malades, d'isoler du contenu intestinal de ces insectes le microbe spécifique suivant la technique qui a été indiquée, et d'ensemencer les bouillons destinés aux infestations subséquentes avec ces cultures. Comme je l'ai dit, il est difficile de dépasser au laboratoire une virulence moyenne, correspondant à la mort de l'insecte sept à huit heures après l'inoculation; avec le coccobacille provenant de sauterelles recueillies dans les bandes infestées quelques jours auparavant, j'ai pu souvent tuer en trois heures et demie; on a donc tout avantage à employer un tel virus à son maximum d'exaltation.

Vérification de la présence du coccobacille dans les cadavres. — Il arrive souvent que l'on ait à rechercher la présence du coccobacille dans des cadavres de sauterelles, de chenilles ou

d'autres insectes recueillis dans les champs déjà desséchés, ou envoyés au laboratoire de régions éloignées ; dans ces cas, il serait très difficile, parfois impossible, de rechercher directement le coccobacille. La méthode suivante m'a donné de très bons résultats et m'a permis d'isoler le microbe de débris de cadavres de sauterelles ou de chenilles mortes depuis plusieurs mois.

Triturer dans un petit mortier ou dans un verre les débris de cadavres avec quelques centimètres cubes de bouillon, et injecter une ou deux gouttes du liquide trouble à quelques sauterelles ; s'il s'agit du coccobacille des sauterelles, ces insectes ne tarderont pas à montrer la diarrhée caractéristique suivie de mort, et du contenu intestinal on pourra isoler le microbe spécifique.

Pour identifier le bacille, on peut avoir recours au sérodiagnostic ; injecter à un lapin dans la veine de l'oreille, à cinq à six reprises différentes, avec un intervalle de sept jours entre chaque injection, une émulsion de coccobacille des sauterelles type, et avec le sérum de ce lapin préparé, pratiquer la réaction d'agglutination suivant la technique ordinaire, avec le coccobacille que l'on veut identifier. Il est bon de faire la première injection avec une émulsion chauffée dix minutes à 70 degrés, pour éviter les abcès qui se produisent parfois quand on injecte d'emblée des bacilles vivants.

Conduite des expériences préliminaires. — Il pourra être utile dans quelques circonstances de pratiquer des expériences préliminaires, par exemple pour vérifier le pouvoir pathogène sur une nouvelle sorte d'acridien, ou pour étudier la marche de l'épizootie dans des régions où les conditions sont très différentes de celles où le coccobacille a été appliqué jusque-là ; de telles expériences on peut tirer des renseignements utiles pour la conduite des infestations sur une grande échelle.

Je tiens tout d'abord à appeler l'attention sur le fait que des essais d'infestation en cage ne donnent que des résultats imparfaits sur lesquels on ne peut se baser ; d'une part, les insectes se trouvent dans des conditions de vie anormales et une mortalité élevée ne prouverait pas grand'chose ; d'un autre côté, il pourrait se faire que la contagion se fasse très lentement, car les insectes s'alimentent en général mal en captivité ; de plus, ils ne se déplacent pas, restent continuellement immo-

biles dans le même coin de la cage, toutes conditions défavorables pour la marche d'une épizootie où la contagion se fait *per os* au moyen des déjections des malades. J'ai vérifié à plusieurs reprises que la mortalité chez les témoins était presque aussi considérable que chez les infestés dans de telles conditions. Pour toutes ces raisons, il est bien préférable de pratiquer les essais de la manière suivante.

Choisir une petite tache de criquets d'un quart à un demi-hectare de superficie, ou détacher une telle portion d'une grande tache, l'enfermer entre barrières de zinc de hauteur suffisante pour qu'aucun ne puisse s'échapper, et avec un espace suffisment étendu pour que les insectes puissent trouver une nourriture abondante. Pratiquer les infestations comme il a été dit.

On peut enfermer une tache témoin de même étendue, en prenant bien soin de faire cet essai témoin à une distance de plusieurs kilomètres du premier, de manière à ce que des criquets malades qui pourraient s'échapper du premier enclos n'aillent pas contaminer des témoins. Inutile de dire également que cet essai n'aura de valeur que si la région est vierge d'infestations depuis plusieurs années, et située à plusieurs milliers de kilomètres d'une telle région ; nous avons vu avec quelle rapidité se propage l'épizootie par les vols. Pour la même raison, il faudra de plus s'assurer que des sauterelles ailées ne sont pas mêlées aux criquets ni ne se trouvent dans les environs, car la maladie pourrait alors facilement être transportée dans l'enclos témoin.

A titre d'indication, je dirai que de semblables essais préliminaires eurent lieu en janvier 1912 dans la province de Santa Fé ; tous les criquets en expérience étaient morts le dixième jour. Les criquets étaient à la dernière période. Une autre expérience fut faite en avril dans la province de La Rioja, sur des criquets arrivés à la troisième mue ; tous moururent également dans le même temps.

Un second mode d'expérience, qui se rapproche encore plus de la réalité, consiste à infester une tache de criquets en liberté et la faire suivre continuellement ; la surveillance est facilitée en établissant une ligne de barrières de zinc de manière à ce que la tache marche continuellement dans une espèce d'avenue ; la largeur de cette avenue varie naturellement avec l'impor-

tance de la bande, mais, en tous cas, elle doit être assez large pour que les insectes ne gênent pas mutuellement et puissent trouver abondamment leur nourriture.

En avril 1912, dans la province de La Rioja, une tache de 4 hectares environ d'étendue, infestée avec quatre litres de bouillon de vingt-quatre heures, fut suivie; les derniers criquets moururent huit jours après l'infestation. Je m'empresse de dire que toutes les circonstances favorisantes se trouvaient réunies et que ce n'est que rarement que l'épizootie se répandra aussi rapidement.

De semblables essais ont l'avantage de se rapprocher le plus possible des conditions naturelles et l'on peut en toute confiance s'appuyer sur eux pour les infestations sur une grande échelle.

Pour des essais à effectuer sur d'autres insectes que les acridiens, l'expérimentateur devra s'inspirer des circonstances, observer les mœurs de l'insecte, se posant comme condition première de se rapprocher le plus possible du mode de vie naturelle ; on n'a qu'à réfléchir un instant aux nombreux facteurs qui interviennent dans la marche d'une épizootie pour voir que le moindre écart entre les conditions de vie de l'insecte dans la nature et celles que l'on voudrait lui imposer dans une expérience peuvent fausser complètement les résultats dans un sens ou dans l'autre.

Particularités observées pendant le cours des épizooties. — Dans les vols de sauterelles infestés peu de temps avant la ponte, de nombreuses femelles pondent des œufs qui n'arrivent pas à maturité ; d'autres femelles n'arrivent pas à pondre et les œufs sont transformés dans le corps même de l'insecte en une masse noirâtre ; les bandes où s'est observé ce phénomène ont été complètement anéanties quelques jours après, tuées par l'épizootie (1).

Les bandes de criquets infestés ne mangent presque pas, et, par conséquent, ne causent que peu de dégâts (2); elles se déplacent, en général, beaucoup moins que les bandes saines, et on observe le cas de bandes qui restent dans le même endroit depuis le moment de l'infestation jusqu'à ce que l'épizootie ait

(1 et 2). Divers rapports des inspecteurs du Ministère de l'Agriculture de la République Argentine, entre autres ceux de l'inspecteur de zone Tribodi et de l'inspecteur de Elia.

accompli son œuvre ; ce dernier fait n'est pourtant pas général et j'ai vu des bandes se déplaçant rapidement, quoique fortement contaminées ; je crois que l'état du terrain influe sur ces déplacements, car j'ai remarqué que si des bandes sont infestées dans des champs couverts de végétation, elles se déplacent peu, au contraire elles continuent leur chemin si la végétation est pauvre ; la question nourriture ne me paraît pas avoir grande importance pourtant, il s'agirait plutôt d'une question d'ombrage.

Dans les bandes de criquets infestés quelques jours avant la dernière mue on observe de nombreuses sauterelles adultes anormales ; les ailes sont peu développées et atteignent à peine la moitié de la longueur ordinaire ; elles ne peuvent voler ; de plus, l'examen microscopique des organes génitaux montre une atrophie complète. Il faudrait rapprocher ces faits de la castration parasitaire décrite par Giard chez des mollusques et chez des insectes parasités par des larves, et de l'apténie décrite par Kunckel d'Herculais, précisément chez des *Schistocerca* parasités par des larves de *Sarcophaga*. Les maladies microbiennes seraient donc également capables de produire ces phénomènes.

Insectes sensibles. I. *Acridiens.* — Le coccobacille des sauterelles doit être pathogène pour toutes les espèces d'acridiens. D'après les campagnes conduites jusqu'à ce jour dans les différents pays, il résulte que les espèces suivantes sont sensibles.

Schistocerca americana. — Épizootie naturelle au Yucatan de 1908 à 1911. Épizootie provoquée dans la République Argentine en 1912.

Caloptenus sp? (*vulgo Tucura*). — Epizootie provoquée en décembre 1912 dans la région du Rio Negro, République Argentine (1).

Stauronautus maroccanus, épizooties provoquées en 1913 en Algérie dans la province d'Oran, et dans l'île de Chypre (2).

II. *Fourmis.* — En juillet 1911, j'ai effectué quelques essais sur une petite fourmi de la région parisienne ; huit jours après les infestations, les fourmilières étaient vides.

(1) Rapport de M. le Dr Laure, au ministère d'Agriculture de la République Argentine.

(2) Rapport de M. W. Francis, Government analyst, à S. Exc. le Gouverneur de Chypre.

J'ai répété le même essai près de Buenos Aires, dans la propriété *La Martona*, de M. Casares, sur *Selenopsis gemminata*. En janvier 1912, huit fourmilières furent infestées chacune avec quelques centimètres cubes de culture; elles se trouvaient au milieu d'un champ contenant une grande quantité de fourmilières éparses. Huit jours après, aucune modification n'avait été observée; deux jours plus tard, c'est-à-dire dix jours après les infestations, six de ces fourmilières étaient vides. Deux mois plus tard, toutes les fourmilières, dans un rayon de 100 mètres des premières infestées, furent trouvées également vides; en dehors de ce rayon, les fourmilières étaient en état d'activité normale; l'épizootie avait gagné peu à peu (1).

M. Lynch, entomologue, essaya d'infester au Chaco des fourmilières d'*Atta sexdens*; les fourmis restèrent inactives pendant plus de vingt jours après infestation, les fourmilières voisines servant de témoins étant dans un état d'activité normale; après ce laps de temps tout rentra dans l'ordre. Les fourmis avaient certainement été atteintes, mais s'étaient remises. Le virus provenait de la sauterelle, sans passages par fourmis, et était en culture depuis plusieurs jours, c'est-à-dire assez atténué (4).

En mai de la même année, à Tucuman, je commençais des passages par *Atta*, pour essayer d'exalter la virulence pour cet insecte, véritable fléau pour toutes les contrées tropicales et subtropicales de l'Amérique. La première série mourut en trente-six heures, avec la particularité que le thorax et la tête fourmillaient de coccobacilles en culture pure, tandis que l'intestin n'en contenait aucun, ce qui était sans doute dû au fait que la réaction du contenu intestinal est acide chez cette fourmi et celle des autres parties du corps alcaline. Obligé de rentrer en France, je chargeai M. Morales de continuer les passages; il parvint à obtenir une virulence capable de tuer les *Atta* en quatre heures, avec pullulation du coccobacille, même dans l'intestin. Ces essais seraient à reprendre, car il est probable qu'on pourrait obtenir un résultat pratique.

(1) Rapport de M. Brethes, entomologue du Ministère de l'Agriculture de la République Argentine.

(2) Rapport de l'inspecteur d'Agriculture M. Lynch Arribalzaga.

Il y aurait lieu également d'étendre les recherches à d'autres insectes nuisibles, les termites en particulier (1).

III. *Chenilles.* — En février 1912, M. Lynch essaya l'effet du coccobacille sur les chenilles qui ravagent les plantations de cotonnier; quatre jours après l'infestation, toutes les chenilles étaient mortes dans le champ en expériences; un champ voisin traité en même temps avec une solution de vert de Paris contenait encore de nombreuses chenilles vivantes.

Lors des infestations dans la région du Rio Negro sur les bandes de *Caloptenus*, les champs étaient couverts de chenilles; quelques jours après, on constata que toutes les chenilles étaient mortes dans les endroits où avaient eu lieu des infestations; j'isolai le coccobacille des cadavres qui me furent remis (2).

Vertébrés réfractaires. — *Oiseaux.* — Les oiseaux sont complètement réfractaires. Des poules nourries exclusivement pendant un mois avec des sauterelles mortes de la maladie au laboratoire, ne furent aucunement incommodées; elles furent gardées à vue pendant quatre mois.

Une poule et un poulet reçurent chacun une injection de deux centimètres cubes de culture de vingt-quatre heures en bouillon dans les muscles pectoraux; ils ne présentèrent aucun symptôme de maladie pendant les quatre mois suivants.

Mammifères. — Six cobayes reçurent chacun 5 cent. cubes de culture en bouillon de vingt-quatre heures en injection hypodermique, sans résultat.

Deux lapins reçurent pendant huit jours pour unique nourriture de l'herbe arrosée de bouillon de culture, ils furent ensuite maintenus pendant un mois en observation; ils ne présentèrent rien d'anormal.

Deux lapins ne présentèrent aucune réaction après injection sous-cutanée de 5 cent. cubes de culture. Quatre autres lapins,

(1) En juin 1913, dans un hôtel particulier, à Paris, dont les communs étaient envahis depuis de longues années par les fourmis, on répandit un peu de culture en bouillon glucosé sur les chemins suivis par ces insectes : quelque temps après les fourmis disparurent.

(2) Rapport de l'ingénieur agronome Campolietti au Ministère de l'Agriculture de la République Argentine.

avec la même dose, présentèrent un abcès à pus consistant au point d'inoculation, abcès qui se résorbèrent peu à peu en quelques jours.

Plusieurs fois des pulvérisations abondantes ont été faites intentionnellement dans des enclos où paissaient des troupeaux de vaches, de chevaux et de moutons; aucun malaise n'a jamais été signalé chez ces animaux.

Pour l'homme, les employés chargés des pulvérisations ont eu souvent les mains et même parfois le visage baignés par le liquide. J'ai vu des ouvriers manger avec leurs doigts, les mains complètement mouillées de bouillon de culture, jamais aucun malaise n'a été signalé. Moi-même, intentionnellement, n'ai jamais pris aucune précaution en manipulant les bouillons de culture, je n'ai jamais ressenti aucun trouble.

Chose étrange : le rat d'égout, si résistant aux infections, a été le seul animal, les insectes exceptés, que j'aie réussi à contaminer par injection hypodermique. L'animal meurt, après injection de 1/4 de cent. cube de culture de vingt-deux heures ayant subi quatre passages par rat, en trois heures et demie, avec septicémie généralisée : le coccobacille se trouve en culture pure dans le sang du cœur. J'espérais obtenir, après plusieurs passages, un virus capable de tuer cet animal *per os*; tout fut inutile. J'ai nourri pendant plus d'un mois des rats avec des grains arrosés de culture, leur donnant comme boisson du bouillon virulent; je n'ai pu relever chez ces animaux aucun trouble, et, après le mois, ils avaient engraissé.

(*A suivre.*)

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

28e ANNÉE AVRIL 1914 N° 4

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'IMMUNITÉ ANTITUBERCULEUSE CHEZ LES BOVIDÉS

par A. CALMETTE et C. GUÉRIN

(Institut Pasteur de Lille.

Dans un précédent mémoire (1), nous avons montré que l'immunité, ou plutôt la tolérance des bovidés à l'infection tuberculeuse, paraît résulter de l'existence préalable de bacilles tuberculeux dans l'organisme de ces animaux, et que cette tolérance est en rapports étroits avec la nature des bacilles tuberculeux mis en œuvre. Nous nous sommes demandé quel rôle respectif, dans la production de cet état relatif d'immunité, pouvaient jouer les éléments constitutifs du bacille de Koch : lipoïdes, tuberculines, protoplasma bacillaire.

Nous nous sommes adressés pour ces recherches aux animaux de l'espèce bovine.

Une première génisse a servi de témoin pour le contrôle de la virulence de notre bacille d'épreuve.

Expérience. — *Génisse bretonne*, âgée de 8 mois, *témoin*, reçoit dans les veines 3 milligrammes de bacilles tuberculeux (souche lait de *Nocard*). La température commence à s'élever à partir du 13e jour, puis elle se maintient aux environs de 40 degrés jusqu'à la mort qui survient le 27e jour.

Autopsie : *Granulie pulmonaire massive.*

(1) Ces *Annales*, février 1913

I. — Action des lipoïdes.

Les lipoïdes qui ont servi à cet essai ont été extraits de bacilles tuberculeux bovins, par épuisement, d'abord par l'acétone bouillant, ensuite par la benzine à l'ébullition ; ils ont été mélangés par fusion, puis lavés pendant deux heures dans un grand excès d'eau bouillante, afin d'enlever la plus grande partie des substances solubles dans l'eau et en particulier les traces de tuberculine qui auraient pu être entraînées. Après refroidissement, les lipoïdes ont été fondus de nouveau pour chasser l'eau. C'est avec ce mélange de lipoïdes solubles dans l'acétone et la benzine que nous avons opéré.

Expérience. — *Génisse bretonne*, âgée de 8 mois, reçoit dans les veines, à 10 jours d'intervalle, deux injections de 100 et de 200 milligrammes de lipoïdes extraits de bacilles tuberculeux, finement émulsionnés à l'aide de bile de bœuf. Ces inoculations sont bien tolérées. 30 jours après la deuxième, l'animal est éprouvé par inoculation intraveineuse de 3 milligrammes de tuberculose bovine (souche de lait de *Nocard*). La température s'élève brusquement le 14e jour pour rester constamment au-dessus de 40 degrés, jusqu'à la mort qui survient le 24e jour après l'épreuve.

Autopsie : *Granulie pulmonaire massive.*

Nous avons répété, depuis, cet essai sur une autre génisse âgée de douze mois : la mort est survenue, dans les mêmes conditions, vingt-sept jours après l'inoculation d'épreuve. *Le rôle joué par les lipoïdes* (extractibles par l'acétone bouillant et la benzine) *dans la prévention de l'infection tuberculeuse apparaît donc nul.*

II. — Action de la tuberculine.

Nous avons expérimenté sur un premier animal l'action préventive de la tuberculine brute préparée à l'aide d'un bacille d'origine bovine et, sur un second, celle de la même tuberculine précipitée par l'alcool.

Expérience. — *Génisse bretonne*, âgée de 8 mois, reçoit dans les veines, à 10 jours d'intervalle, deux inoculations de 10 cent. cubes de *tuberculine brute de Koch.* Ces inoculations sont bien tolérées, 30 jours après la seconde, l'animal est éprouvé par inoculation intraveineuse de 3 milligrammes de tuberculose bovine (souche *Nocard*). Pendant les 30 jours qui suivent, la tem-

pérature est irrégulière; l'animal manifeste des poussées allant jusqu'à 40 degrés et dont la durée est de 24 heures à 3 jours. En même temps que l'appétit devient capricieux, l'amaigrissement survient, puis, vers le 40e jour, apparaît une toux fréquente. L'état général devient de plus en plus précaire; enfin l'animal, incapable de se relever, est abattu *in extremis* le 58e jour après l'épreuve.

Autopsie : Les poumons présentent une grande quantité de tubercules de la grosseur d'un grain de millet à celle d'un grain de chènevis. Les plus petits sont presque tous translucides; quelques-uns cependant commencent à se caséifier au centre. Les plus gros sont tous caséeux.

Les ganglions bronchiques et médiastinaux sont quadruplés de volume et farcis de follicules tuberculeux caséeux ou en voie de caséification. Rate indemne. Le foie présente trois tubercules gros comme un grain de chènevis, caséeux; le ganglion du foie montre sur sa coupe deux tubercules caséeux de la grosseur d'un grain de millet. Ganglions mésentériques indemnes.

Tuberculose aiguë à marche rapide.

Expérience. — *Génisse bretonne*, âgée de 8 mois, reçoit dans les veines, à 10 jours d'intervalle, deux inoculations de 20 et de 50 centigrammes de *tuberculine précipitée par l'alcool*. Ces inoculations sont bien tolérées. 30 jours après la seconde, l'animal est éprouvé par inoculation intraveineuse de 3 milligrammes de tuberculose bovine (souche *Nocard*). La température s'élève à partir du 17e jour aux environs de 40 degrés pendant 9 jours, puis elle tend à revenir à la normale, tout en manifestant quelques poussées; l'animal mange moins, maigrit, commence à tousser; l'état général devient de plus en plus mauvais, et la mort survient 57 jours après l'épreuve.

Autopsie : Les deux poumons sont farcis d'un nombre incalculable de fins tubercules, les uns encore translucides, les autres, plus nombreux, déjà caséeux au centre. Les ganglions bronchiques et médiastinaux sont énormes et farcis de follicules tuberculeux en voie de caséification.

Tuberculose aiguë à marche rapide.

Il résulte de ces deux expériences que *l'injection préalable, à doses assez élevées, de tuberculine brute* ou *précipitée, retarde sensiblement l'évolution de la tuberculose d'épreuve.* Cependant le rôle préventif des tuberculines est peu marqué, car il se borne à substituer, lors de l'inoculation d'épreuve, une tuberculose aiguë à marche rapide à une granulie massive suraiguë.

III. — Action des bacilles entiers tués par la chaleur et lavés.

Bien que l'expérience relatée ci-après ne puisse nous donner aucune indication positive sur la valeur du protoplasma bacillaire, puisque les bacilles ont été chauffés, et que, d'autre part, le lavage le plus minutieux ne suffise certainement pas à enle-

ver toute la tuberculine que retient le protoplasma, nous avons voulu cependant l'effectuer pour vérifier si le faible pouvoir préventif que les différents auteurs qui se sont occupés de la question attribuent aux bacilles morts est sous la dépendance de la tuberculine que ces bacilles renferment, cette substance, immobilisée dans les cadavres bacillaires, agissant peut-être alors plus sûrement que les solutions introduites à dose massive dans le système circulatoire.

Expérience. — *Génisse bretonne*, âgée de 8 mois, reçoit dans les veines 20 milligrammes de *bacilles tuberculeux* (souche *Nocard*) *tués par un chauffage de* 36 *minutes* à 65 *degrés*, puis lavés à l'eau salée physiologique. 30 jours après, l'animal est éprouvé par l'inoculation intraveineuse de 3 milligrammes de tuberculose bovine (souche *Nocard*). La génisse manifeste, le soir même de l'injection, une violente réaction tuberculinique, puis la température tend à revenir à la normale, avec quelques petites poussées passagères. La santé de l'animal reste apparemment satisfaisante et aucun signe objectif ne peut laisser supposer l'évolution de la maladie. Tuberculinée 90 jours après l'épreuve, la génisse réagit violemment (2°3). Elle est abattue le jour même.

Autopsie : Dans le poumon droit, sept tubercules de la grosseur d'un grain de millet, caséeux. Dans le poumon gauche, quatre tubercules dont un de la grosseur d'un grain de chènevis; tous caséeux.

Dans les ganglions bronchiques et médiastinaux, nombreux follicules caséeux.

Tuberculose chronique à marche lente.

IV. — Action du protoplasma bacillaire.

Pour élucider le rôle joué dans la prévention de la tuberculose par le protoplasma bacillaire, il était nécessaire de mettre en œuvre des bacilles sur lesquels n'interviendraient ni la chaleur ni antiseptiques, et chez lesquels la tuberculine serait détruite au fur et à mesure de sa production par le milieu même de culture, de sorte que les bacilles ne pourraient en entraîner avec eux. Nos bacilles bovins, cultivés en longues séries (70 passages) sur bile de bœuf glycérinée, répondent à ce double desideratum. Les cultures de ces bacilles sur ce milieu sont fragiles et meurent au bout de quelques semaines, deux mois au maximum ; après ce délai, ces cultures ne sont plus revivifiables par l'ensemencement sur pomme de terre biliée, ou sur pomme de terre glycérinée ordinaire. Nous nous sommes assurés d'autre part que les milieux de culture sur lesquels ces bacilles se sont développés ne contiennent pas de

tuberculine, car ils ne produisent aucune réaction lorsqu'on les injecte, même à doses élevées (5 cent. cubes sous la peau des bovidés tuberculeux).

Expérience. — Deux vaches adultes, une hollandaise, l'autre flamande, tuberculeuses, mais n'ayant pas été tuberculinées depuis plus d'un an, reçoivent sous la peau, l'une, n° 1, *hollandaise*, 5 cent. cubes du liquide de culture de bacilles bovins sur pomme de terre biliée (71e passage), âgée de 60 jours, stérilisée et filtrée. Température initiale : 38°5; 12e heure, 38°0; 15e heure, 38°6; 18e heure, 38°5.

Aucune réaction.

L'autre, n° 2, *flamande*, 5 cent. cubes du liquide de culture de bacilles bovins sur pomme de terre ordinaire glycérinée, âgée de 60 jours, stérilisée et filtrée. Température initiale : 38°7; 12e heure, 39°3; 15e heure, 39°6; 18e heure, 40°5.

Réaction nettement positive : 1°8.

Le lendemain de ce jour, la vache n° 1, hollandaise, qui n'a pas réagi aux produits de culture du bacille bilié, reçoit sous la peau 5 cent. cubes du culot d'une culture de bacilles bovins sur pomme de terre glycérinée ordinaire.

Température initiale : 38°5; 12e heure, 39°6; 15e heure, 39°9; 18e heure, 40°2.

Réaction positive : 1°7. — Cet animal était donc bien tuberculeux.

On pouvait se demander si la propriété acquise par le bacille bovin de ne pas fournir de tuberculine dans les cultures faites en présence de bile était due simplement à l'action de la bile sur la tuberculine, ou bien si elle tenait à une modification profonde et définitive du bacille sous l'influence de ce même milieu. Or, nous avons constaté que notre bacille n'a en aucune manière perdu sa faculté de produire de la tuberculine. En effet, après 70 passages consécutifs sur bile de bœuf, ce même bacille bovin a été reporté sur pomme de terre ordinaire glycérinée, et, après 9 passages sur ce nouveau milieu, le liquide des tubes de culture a servi à tuberculiner des animaux tuberculeux qui ont réagi dans les formes ordinaires.

Expérience. — Deux vaches adultes *hollando-flamandes*, tuberculeuses, n'ayant pas été tuberculinées depuis plus d'un an, reçoivent sous la peau 5 cent. cubes du liquide de culture de bacille bilié, reporté par neuf passages successifs sur pomme de terre glycérinée ordinaire (ce liquide étant au préalable stérilisé et filtré) :

Vache n° 1. — Température initiale : 38°3; après 12 heures, 39°3 : 15e heure, 40 degrés; 18e heure, 39°6. *Réaction positive* : 1°7.

Vache n° 2. — Température initiale : 38°5; après 12 heures, 39°3; 15e heure, 40°1; 18e heure, 39°4. *Réaction positive* : 1°6.

Nous avons pu nous assurer cependant que si le bacille bilié fournit de nouveau de la tuberculine par son retour au mode

de culture primitif sur pomme de terre glycérinée ordinaire. l'atténuation de sa virulence, ainsi que nous l'avons dit, reste acquise et demeure héréditaire.

Expérience. — 4 *cobayes* reçoivent sous la peau de la cuisse 1/10 milligramme de bacille bilié reporté sur pomme de terre glycérinée ordinaire, après neuf passages sur ce milieu. 90 jours après l'inoculation, il est impossible de déceler aucune tuméfaction au niveau de l'injection. Les ganglions inguinaux voisins sont indemnes. C'est par l'action de la bile seule que la tuberculine produite par notre bacille se trouve modifiée ou détruite, au fur et à mesure de sa production, ainsi qu'il est facile de s'en convaincre en effectuant des mélanges de tuberculine et de bile stérile et en les injectant à des bovidés tuberculeux :

Expérience. — Deux *vaches adultes tuberculeuses*, n'ayant pas été tuberculinées depuis plus d'un an, reçoivent sous la peau 4/10 de cent. cube de tuberculine brute de Koch dilués dans 4 cent. cubes de bile de bœuf stérilisée, et maintenus en contact pendant 8 heures à l'étuve à 38 degrés.

Vache n° 1. — Température initiale : 38°3; 12e heure, 38°6; 15e heure, 39°1; 18e heure; 38°4.

Vache n° 2. — Température initiale : 39 degrés; 12e heure, 38°6; 13e heure. 39°1; 18e heure 38°9.

Réactions négatives.

Soumis le lendemain à l'épreuve de la même dose de tuberculine ordinaire. ces deux animaux réagissent *positivement*, respectivement de *1°9* et *2°1*.

Vache adulte tuberculeuse (*témoin*). Reçoit sous la peau 4/10 de cent. cube de tuberculine brute de Koch dilués dans 4 cent. cubes d'eau stérile.

Vache n° 3. — Température initiale : 38°6; 12e heure, 40°9; 15e heure, 40°9; 18e heure, 39°9.

Reaction nettement positive : 2°3.

Il est donc hors de doute que, dans l'expérience suivante, nous avons employé des bacilles morts, dont le protoplasma n'a été modifié ni par l'action de la chaleur, ni par des antiseptiques, et qui ne renfermaient pas de tuberculine active, puisque celle-ci est inexistante dans le milieu à base de bile de bœuf :

Expérience. — *Génisse bretonne*, âgée de 8 mois, reçoit dans les veines 100 milligrammes de bacilles biliés du 70e passage, culture âgée de 6 mois, morte et ne contenant pas de tuberculine. 30 jours après cette inoculation, très bien tolérée, l'animal est éprouvé par l'injection intraveineuse de 3 milligrammes de bacilles bovins (souche *Nocard*). Le jour de cette inoculation, on ne constate aucune réaction tuberculinique. La température reste normale jusqu'au 11e jour; puis elle s'élève brusquement pour se maintenir, à partir du 16e jour, constamment au-dessus de 40 degrés. La mort de la génisse survient le 28e jour après l'épreuve.

Autopsie : *Granulie pulmonaire massive.*

On peut supposer que le défaut de pouvoir préventif du protoplasma bacillaire tient à ce fait que, comme nous l'avons indiqué précédemment, les bacilles tuberculeux ne se résorbent pas dans l'organisme, et qu'un tel protoplasma n'entraînant pas avec lui de tuberculine, cette dernière ne peut conférer à l'organisme une tolérance relative comparable à celle que l'on observe à la suite de l'inoculation de tuberculine seule.

L'expérience qui suit atteste l'exactitude de cette hypothèse et elle montre, en outre, que la tuberculine de Koch, ajoutée à ce protoplasma bacillaire qui en est positivement dépourvu, est insuffisante à conférer à l'organisme une résistance durable :

Expérience. — *Génisse bretonne* âgée de 8 mois, reçoit dans les veines 100 milligrammes de *bacilles bilités du 70e passage*, culture âgée de 6 mois, *morte*. Ces bacilles ont été *triturés* au mortier d'agate *avec 2 cent. cubes de tuberculine brute*. Cette émulsion est restée 24 heures à l'étuve, puis injectée. 30 jours après cette inoculation, d'ailleurs très bien tolérée, l'animal est éprouvé par injection intraveineuse de 3 milligrammes de bacilles bovins (souche *Nocard*). Le jour de cette inoculation, on ne constate aucune réaction tuberculinique. La température reste normale jusqu'au 14e jour; puis elle s'élève et se maintient aux environs de 40 degrés pendant une dizaine de jours. Elle s'abaisse ensuite et tend à revenir à la normale, avec, cependant, quelques poussées vespérales. Vers le 40e jour, l'appétit de la génisse devient capricieux; elle tousse de temps en temps; l'état général devient de plus en plus précaire et la mort survient 54 jours après l'épreuve.

Autopsie : Les deux poumons sont parsemés d'une grande quantité de tubercules variant de la grosseur d'une tête d'épingle à celle d'un grain de chènevis. Les plus petits commencent à se caséifier au centre; les plus gros sont complètement caséeux. Le tissu pulmonaire n'est pas hépatisé. Les ganglions bronchiques et médiastinaux sont énormes et farcis de follicules caséeux. Sur la rate, 5 petits tubercules caséeux. Sur le foie, 3 petits tubercules caséeux; le ganglion du foie montre sur sa coupe 3 tubercules de la grosseur d'un grain de millet, caséeux.

Tuberculose aiguë.

V. — Action préventive des bacilles vivants.

Pour montrer que la tolérance des bovidés au regard de l'infection tuberculeuse est bien fonction de la présence préalable de bacilles tuberculeux *vivants* dans leur organisme, rappelons l'expérience que nous avons déjà publiée (1).

Expérience. — *Huit génisses bretonnes*, âgées de 9 mois, indemnes de tuberculose, reçoivent dans les veines, à un mois d'intervalle, respectivement 1 et

(1) Ces *Annales*, février 1913.

5 milligrammes de culture de bacille bovin des 33e et 34e passages sur bile de bœuf.

Trente jours après la seconde inoculation, ces animaux sont éprouvés, en même temps qu'un témoin neuf, du même âge et du même lot, par l'inoculation intraveineuse de 3 milligrammes de tuberculose virulente (souche *Nocard*).

Le *témoin* présente le tableau clinique ordinaire : le 16e jour, la température s'élève brusquement et se maintient à 40 degrés jusqu'à la mort survenue le 34e jour après l'inoculation.

Aucune des huit génisses vaccinées ne manifeste la moindre hyperthermie. Elles restent parfaitement bien portantes.

Sept d'entre elles sont respectivement abattues 1, 2, 3, 4, 8, 12 et 18 mois après l'épreuve. A chaque autopsie, les ganglions bronchiques sont prélevés, triturés en *totalité*, et le triturat injecté sous la peau de la cuisse de 12 cobayes, qui sont examinés et sacrifiés après deux mois.

Les résultats des autopsies et des inoculations sont consignés dans le tableau ci-dessous :

Nos des génisses.	ABATAGE	AUTOPSIE	INOCULATIONS aux cobayes.
60	1 mois ap. l'épreuve.	Indemne de tuberculose.	Tous tuberculeux.
61	2 mois ap. l'épreuve.	Indemne de tuberculose.	Tous tuberculeux.
62	3 mois ap. l'épreuve.	Indemne de tuberculose.	Tous tuberculeux.
63	4 mois ap. l'épreuve.	Indemne de tuberculose.	Tous tuberculeux.
64	8 mois ap. l'épreuve.	Indemne de tuberculose.	Tous tuberculeux.
65	12 mois ap. l'épreuve.	Indemne de tuberculose.	Tous tuberculeux.
66	18 mois ap. l'épreuve.	Indemne de tuberculose.	Tous tuberculeux.
67	Témoin mort en 34 jours.	*Granulie massive.*	Tous tuberculeux.

On voit par cette dernière série d'expériences que toutes nos génisses vaccinées avec de minimes quantités de *bacilles biliés vivants* ont conservé, vivants et virulents, dans leurs ganglions bronchiques, des bacilles d'épreuve, et ce *jusqu'à dix-huit mois*, sans que jamais ces bacilles aient manifesté leur présence dans l'organisme de nos bovidés par aucune lésion tuberculeuse évolutive. L'autopsie de chacun d'eux, faite avec le plus grand soin, n'a jamais permis de déceler, dans les différents groupes ganglionnaires, la moindre trace de tubercules, non plus que dans les différents viscères et dans les poumons.

Conclusions.

De ces faits expérimentaux nous devons conclure :

I. — Que les *lipoïdes* solubles dans l'acétone bouillant et la benzine, extraits du bacille tuberculeux, n'ont aucune action préventive ;

II. — Que les *tuberculines* (brute ou précipitée), telles qu'elles sont habituellement préparées dans les laboratoires, ont une action manifeste, mais réduite à un simple ralentissement dans la durée d'évolution de l'infection ;

III. — Que les *bacilles tués par la chaleur*, provenant des cultures ordinaires sur milieux glycérinés, ont un faible pouvoir préventif, lequel résulte de la petite quantité de tuberculine entraînée par eux ou retenue dans les corps microbiens ;

IV. — Que le *protoplasma bacillaire intact, provenant de bacilles morts privés de tuberculine, est dépourvu de toute action immunisante* ;

V. — Que la *tolérance durable des bovidés vis-à vis de l'infection tuberculeuse est fonction de la présence, dans l'organisme de ces animaux, de bacilles vivants.* La vie saprophytique du bacille tuberculeux dans l'économie entraîne l'élaboration de produits solubles immunisants, différents de ceux recueillis artificiellement dans les milieux de culture.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE LA RÉACTION DE FIXATION DE BORDET-GENGOU
AU COURS
DE L'INFECTION ET DE L'IMMUNISATION TUBERCULEUSE

par A. CALMETTE et L. MASSOL.

(Institut Pasteur de Lille.)

I

Depuis plusieurs années, nous poursuivons des recherches sur la *réaction de Bordet-Gengou* dans l'infection tuberculeuse et nous avons signalé (1) les effets empêchants que produit un excès de sérum ou d'antigène sur la fixation de l'alexine. Nous avons attiré en outre l'attention (2) sur ce fait que certains sérums (que nous appelons *inhibants*) possèdent à un haut degré la propriété d'empêcher cette même fixation de l'alexine sur les antigènes, et peuvent aussi exercer cette propriété inhibante en présence d'autres sérums.

De l'ensemble de nos recherches (3) nous avions conclu que certains sérums riches en sensibilisatrices tuberculeuses, précipitants (tels que le sérum de *Ruppel et Rickmann* préparé par la fabrique de Höchst), fournissent une réaction de fixation positive en présence des bacilles tuberculeux, de la tuberculine brute de Koch et des plus minimes quantités de nos antigènes B1 (soluble dans l'eau) et B2 (soluble seulement dans l'eau peptonée) ; tandis que d'autres sérums, eux aussi riches en sensibilisatrices et précipitants (sérums de nos bovidés hyperimmuns, sérum de Vallée, etc.) ne donnent des réactions de fixation positives que lorsqu'on les emploie à doses conve-

(1) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 13 novembre 1909.
(2) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 5 février 1910.
(3) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 22 juillet 1911 et 13 juillet 1912.

nables et seulement en présence de quantités de bacilles, de tuberculine brute ou de notre antigène B2 environ trois fois supérieures à celles qu'exigent les premiers sérums, tandis qu'avec notre antigène B1 aucune fixation n'est obtenue.

Nous avons constaté, d'autre part, qu'un excès de ces derniers sérums empêche le phénomène de fixation de l'alexine et c'est parce qu'ils possèdent cette curieuse propriété que, pour la commodité du langage, nous les avons appelés *inhibants*. Ils exercent cette même action empêchante ou inhibitrice vis-à-vis des sérums de malades tuberculeux ou d'animaux hyperimmuns qui, lorsqu'ils sont mis isolément en présence de l'un ou de l'autre antigène B1 et B2, de tuberculine brute ou de bacilles, se montrent plus ou moins riches en sensibilisatrices nettement titrables.

Grâce à nos deux antigènes, dont nous indiquerons tout à l'heure le mode de préparation, nous avons été conduits à classer les sérums renfermant des sensibilisatrices tuberculeuses en deux groupes :

L'un, groupe A, comprenant les sérums non inhibants qui contiennent des sensibilisatrices décelables par tous les antigènes, y compris nos antigènes B1 et B2 ;

L'autre, groupe B, comprenant les sérums *inhibants*, et dont les sensibilisatrices ne sont décelables que par certains antigènes et en particulier par notre antigène B2.

II

Préparation et mode d'emploi des antigènes.

Les sérums du groupe A peuvent constituer d'excellents réactifs de la tuberculine telle qu'elle est contenue dans le produit connu sous le nom de *tuberculine brute de Koch*. Certains d'entre eux, dans nos expériences, ont permis d'obtenir des réactions de fixation positives avec 0 cent. cube 01 de cette substance. Dans les mêmes conditions, il fallait 0 cent. cube 02 à 0 cent. cube 03 de la même tuberculine avec les sérums du groupe B.

Mais si l'on prépare la tuberculine en séparant préalablement les bacilles avant d'opérer la concentration du liquide, le pro-

duit obtenu se montre incapable (excepté pour quelques sérums) (1), de servir d'antigène, aussi bien avec les sérums du groupe A qu'avec ceux du groupe B. Il apparaît donc que dans la tuberculine brute, là où les substances susceptibles de remplir la fonction antigène vis-à-vis des sensibilisatrices tuberculeuses (alors même que l'inhibitrice existe à côté de celles-ci) proviennent des bacilles et manquent totalement dans les bouillons glycérinés sur lesquels ils ont poussé.

D'autre part, nous avons pu établir (2) que les *extraits* simplement préparés par macération au bain-marie (pendant quarante-huit heures à 65 degrés), de 5 grammes de bacilles bien lavés (pesés à l'état sec) et émulsionnés dans 1 litre d'eau distillée, puis filtrés et concentrés à 100 cent. cubes, représentent un antigène (B1) parfaitement utilisable pour déceler les sensibilisatrices contenues dans les sérums du groupe A, tandis qu'il ne permet en aucune manière de déceler les sensibilisatrices des sérums du groupe B.

Par contre, si le même extrait bacillaire est préparé, non plus avec de l'eau distillée, mais par macération dans une solution de peptone de Witte à 1 p. 100, on constate que l'antigène (B2) ainsi obtenu donne des réactions de fixation positives à la dose de 0 cent. cube 1, même avec les sérums du groupe B, dont les sensibilisatrices n'étaient pas mises en évidence avec 1 cent. cube de l'extrait aqueux sans peptone.

Et cependant la peptone est inactive par elle-même, car si on l'ajoute, dans la proportion de 10 p. 100, à l'extrait aqueux simple, après la préparation de celui-ci, le liquide obtenu ne décèle jamais les sensibilisatrices que renferment les sérums du groupe B. C'est donc que la peptone enlève aux bacilles, par macération prolongée à chaud, un antigène insoluble dans l'eau pure.

L'expérience montre que notre antigène peptoné convient pour la recherche des sensibilisatrices dans les sérums de sujets tuberculeux ou d'animaux hyperimmuns, même lorsque ces sérums sont inhibants. Il offre l'avantage d'être facile à préparer dans des conditions sensiblement identiques et d'éliminer

(1) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 13 juillet 1912.
(2) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 28 octobre 1911.

l'intervention des substances complexes, pour la plupart inactives, que renferme la tuberculine brute de Koch.

Il est remarquable de constater que cette dernière, lorsqu'on l'a purifiée par plusieurs précipitations à l'alcool et bien qu'elle ait conservé ses propriétés toxiques pour le cobaye tuberculeux, ne peut plus servir d'antigène vis-à-vis des sensibilisatrices contenues dans les divers sérums que nous avons étudiés. Elle est généralement inutilisable pour la pratique des réactions de fixation.

Grâce à ces deux antigènes B1 et B2, nous avons pu étudier 134 *sérums d'hommes tuberculeux* (1). Ces sérums se classent comme suit :

Groupe A : 62 sérums réagissant avec les antigènes B1 et B2, soit 46,25 p. 100 ;

Groupe B : 62 sérums réagissant seulement avec l'antigène B2, soit 46,25 p. 100.

L'antigène B2 permet ainsi d'obtenir une réaction positive dans 92,5 *p.* 100 *des cas de tuberculose humaine : il possède donc une réelle valeur diagnostique.*

En outre (2) nous avons pu constater que les anticorps décelables seulement par l'antigène B2 proviennent principalement de sérums de tuberculeux au début ; au contraire, l'antigène B1 permet de mettre en évidence les anticorps provenant généralement de tuberculeux avancés.

Nous avons pu étudier l'antigène préparé par Besredka et que notre ami a eu l'obligeance de nous envoyer. Nous le rangeons parmi les antigènes complets du type B2, qui mettent en évidence les sensibilisatrices de nos deux classes de sérums. Sa valeur, calculée à une concentration dix fois plus forte (puisque sa préparation ne comporte pas de réduction au dixième), est sensiblement comparable à celle de l'antigène B2 et de la tuberculine de Koch.

Les faits qui précèdent nous ont conduits à pousser plus avant l'étude des sérums de sujets tuberculeux ou d'animaux hyperimmums et de préciser dans quelles conditions s'observent les phénomènes d'inhibition de la *réaction de Bordet-Gengou.*

(1) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 13 juillet 1912.
(2) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 20 juillet 1912.

En 1901, Neisser et Wechsberg avaient déjà indiqué que le phénomène de bactériolyse ne se produit pas en présence d'un excès d'immunsérum et, conformément à la théorie d'Ehrlich, ils pensaient que l'ambocepteur libre, non fixé sur les bacilles, s'emparait de l'alexine qui, dès lors, ne pouvait plus concourir à la bactériolyse.

Dans un mémoire publié dans ces *Annales* (1905) P. Gay a montré que le même fait s'observe lors des réactions d'hémolyse lorsqu'on emploie des hématies incomplètement débarrassées de leur sérum. Ce dernier, en présence de la sensibilisatrice hémolytique, happe l'alexine qui ne peut plus intervenir dans l'hémolyse. L'explication fournie par P. Gay s'applique également au phénomène de Neisser et Wechsberg : l'émulsion de bacilles laisse diffuser des produits protoplasmiques qui fixent l'excès de sensibilisatrice. Si l'on admet que ces produits ainsi sensibilisés ont une plus grande affinité pour l'alexine que les microbes sensibilisés, il est évident que l'alexine sera déviée et ne pourra plus entrer en jeu dans la réaction de bactériolyse.

Les travaux de Moreschi, puis ceux de R. Muir et W.-B.-M. Martin (1) sur les anticompléments, apportèrent d'autre part la preuve des effets empêchants ou inhibants d'un excès d'antisérum ou d'un excès d'antigène sur la fixation de l'alexine. Mais ces expérimentateurs n'ont étudié que les sérums précipitants.

III

Mise en évidence de la propriété inhibitrice de certains sérums d'animaux hyperimmuns. — Technique.

On effectue le mélange suivant :

20 cent. cubes de sérum de bovidé hyperimmun,
1 cent. cube d'extrait bacillaire non peptoné B1,
9 cent. cubes d'eau salée physiologique.

Après une heure de séjour à 37 degrés et dix-huit heures à la glacière, il s'est formé un précipité. On agite et on divise le mélange en deux portions égales A et B. L'une, A, est

1) *Berlin. Klin. Woch.*, 1906, p. 101; *Journ. of Hygiene*, 1906.

centrifugée. On décante le liquide surnageant et on émulsionne le précipité dans un volume d'eau salée égal au volume du liquide décanté.

Ce précipité de A émulsionné, le liquide décanté de A après centrifugation et la portion B non centrifugée vont, à des dilutions différentes, nous servir à effectuer des réactions de fixation et nous les emploierons soit seuls, soit en présence d'un sérum de cheval dont la teneur en sensibilisitrice a été préalablement déterminée en présence de l'extrait bacillaire B1.

Faisons d'abord une expérience témoin avec, comme antigène, une dose de 0 cent. cube 5 d'extrait bacillaire aqueux, non peptoné (B1) dilué à différents titres, et le sérum de cheval sensibilisant (tableau I).

TABLEAU I. — *Expérience-témoin.*

Alexine fraîche de cobaye diluée au 1/4 (2).	0 c.c. 5 de sérum sensibilisant et 0 c.c. 5 d'extrait bacillaire B1 dilué au : (1)			
—	1/30	1/60	1/90	1/150
0 c.c. 1	—	—	—	—
0 c.c. 2	—	—	—	+
0 c.c. 3	—	—	+	+
0 c.c. 4	—	±	+	+
0 c.c. 5	—	+	+	+

Pour la simplification des tableaux et la commodité de leur lecture, nous indiquons une fois pour toutes que, dans la longue suite de ces expériences, nous avons constamment employé des hématies lavées de chèvre et un sérum hémolytique de cheval antichèvre. La dose d'hématies utilisée est de 0 cent. cube 025, rapportée au volume de sang frais initial d'où elles proviennent. Celle de sérum hémolytique représente toujours au minimum *vingt fois la dose minima hémolytique* de ce sérum. La fixation de l'alexine s'effectue toujours sous le volume de 2 cent. cubes 5.

Les mélanges antigène, sérum sensibilisant et alexine sont maintenus d'abord à l'étuve à 37 degrés pendant une heure. Puis on ajoute les hématies, le sérum hémolytique, de l'eau physiologique pour amener le volume dans chaque tube à

(1) Le signe + signifie hémolyse totale.
Le signe — signifie absence totale d'hémolyse, donc fixation de l'alexine.
Le signe ± signifie fixation incomplète.
(2) La dose minima hémolytique de cette alexine était de 0 c.c. 0075.

3 cent. cubes; on reporte à l'étuve à 37 degrés pendant une heure. Après ce délai, on lit les résultats, qui ne se modifient d'ailleurs plus si l'on attend davantage.

Des tubes témoins avec l'antigène et le sérum seuls ont fourni une hémolyse complète.

On voit donc que, selon la méthode de titrage que nous avons mise en pratique (1), et par laquelle l'*unité* d'antigène est représentée par la quantité d'antigène capable de dévier une dose minima hémolytique d'alexine, 1 cent. cube de l'antigène B1 employé dans cette expérience témoin contenait 1200 à 1600 unités d'antigène. Pour le but que nous nous proposions cette approximation nous a paru suffisante.

Les réactions de fixation effectuées d'après le même schéma avec le précipité de A émulsionné, avec le liquide décanté de A après centrifugation et avec la portion B respectivement seuls ou en mélange avec 0 cent. cube 5 du sérum sensibilisant de cheval, se sont montrées toutes *négatives*. 1 cent. cube d'antigène contenait donc moins de 200 unités. Plus de 84 p. 100 de l'antigène a été masqué. L'antigène (extrait bacillaire non peptoné) B1, mis en contact avec notre sérum de bovidé hyperimmun, a perdu la propriété de fixer l'alexine. *C'est donc que ce dernier renferme une substance (inhibitrice) qui empêche ou masque la fixation.*

IV

Influence de l'ordre dans lequel on met en présence les divers éléments de la réaction de fixation.

Nous avons cherché à déterminer l'influence que pouvait exercer, sur la mise en évidence de l'inhibitrice, l'ordre dans lequel les divers éléments de la réaction de fixation sont mis en présence. Les mélanges suivants ont donc été effectués, chacun avec des doses variables d'alexine (de 0 cent. cube 1 à 0 cent. cube 6 d'alexine diluée au quart);

A. — 0 c.c. 5 de sérum sensibilisant de cheval + 0 c.c. 5 d'antigène B1 dilué à 1 p. 40 + 0 c.c. 5 d'eau salée physiologique + alexine.

(1) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 6 janvier 1912.

B. — 0 c.c. 5 d'antigène B1 dilué à 1 p. 40 + 0 c.c. 5 de sérum de bovidé inhibant dilué à 1 p. 10 + 0 c.c. 5 de sérum sensibilisant + alexine.

C. — Même expérience avec un sérum de bovidé *sain*, remplaçant celui de bovidé *hyperimmun* inhibant.

D. — 0 c.c. 5 d'antigène B1 dilué à 1 p. 40 + 0 c.c. 5 de sérum de cheval sensibilisant (trente minutes à 37 degrés) + 0 c.c. 5 de sérum de bovidé inhibant dilué à 1 p. 10 + alexine.

E. — Même expérience avec sérum de bovidé sain remplaçant le sérum de bovidé hyperimmun inhibant.

F. — 0 c.c. 5 d'antigène B1 dilué à 1 p. 40 + 0 c.c. 5 de sérum de cheval sensibilisant + alexine (une heure à 37 degrés) + 0 c.c. 5 de sérum de bovidé inhibant dilué à 1 p. 10 (trente minutes à 37 degrés).

G. — Même expérience avec sérum de bovidé *sain* remplacant le sérum de bovidé inhibant.

On s'est préalablement assuré que le sérum de bovidé inhibant, chauffé ou non à 58 degrés, ne donne pas d'hémolyse en présence du sérum hémolytique, ce qui est d'ailleurs vérifié par l'expérience F ci-dessus.

Dans cette série d'expériences, tous les tubes des séries B et D sont hémolysés. Tous les autres ont fourni une réaction de fixation positive.

Donc, *tant que l'antigène B1 et les sensibilisatrices libres du sérum de cheval n'ont pas fixé l'alexine, le sérum inhibant empêche la fixation et, quand celle-ci s'est effectuée, le sérum inhibant ne peut plus remettre l'alexine en liberté.*

Précisons maintenant le temps de contact nécessaire pour que cette fixation de l'alexine soit définitive.

Dans une première expérience, nous déterminons à des temps variables la fixation de l'alexine par le complexe antigène B1 + sérum de cheval sensibilisant, en ajoutant le sérum hémolytique et les hématies aux temps indiqués sur les tableaux.

Dans une seconde expérience, après les mêmes temps de contact de l'antigène, des sensibilisatrices et de l'alexine, nous ajoutons le sérum inhibant, le sérum hémolytique et les hématies.

Enfin, dans une troisième expérience, après addition du sérum inhibant, aux temps indiqués, au complexe antigène + sensibilisatrices + alexine, nous portons une heure à 37 degrés, puis nous ajoutons le sérum hémolytique et les hématies.

Exp. I.

Alexine au 1/4	TEMPS 0	5′	10′	20′	60′
0 c.c. 1	+	+	—	—	—
0 c.c. 2	+	+	+	—	—
0 c.c. 3	+	+	+	+	—
0 c.c. 4	+	+	+	+	±

Pas de sérum inhibant. La fixation, *nette* déjà après 10′, augmente ensuite avec le temps.

Exp. II.

Alexine au 1/4	TEMPS 0	5′	10′	20′
0 c.c. 1	+	+	—	—
0 c.c. 2	+	+	+	—
0 c.c. 3	+	+	+	+
0 c.c. 4	+	+	+	+

L'addition de sérum inhibant ne remet pas en liberté l'alexine fixée. L'hémolyse correspond à celle que produit l'alexine restée libre dans l'expérience I.

Exp. III.

Alexine au 1/4	TEMPS 0	5′	10′	20′
0 c.c. 1	—	—	—	—
0 c.c. 2	—	—	—	—
0 c.c. 3	+	—	—	—
0 c.c. 4	+	±	—	—

L'addition de sérum inhibant après l'alexine empêche d'autant moins la fixation que la durée de contact préalable de l'alexine avec l'antigène et les sensibilisatrices a été plus longue.

Quand la fixation est commencée, le sérum inhibant ne peut plus l'entraver. Il en résulte que, pour observer sûrement les phénomènes d'inhibition, on doit faire intervenir toujours le sérum inhibant avant l'addition de l'alexine.

V

Recherche et dosage de l'alexine qui échappe a la fixation.

Dans nos expériences d'inhibition précédemment rapportées (IV), nous constatons que la quantité d'alexine non fixée par suite de la présence du sérum inhibant est suffisante pour produire l'hémolyse. Ce complément libre pourrait ne représenter, par exemple, qu'une dose minima hémolytique. L'inhibition se produirait alors sans qu'il en résulte nécessairement que toute l'alexine soit libre, puisque certains tubes renferment jusqu'à 15 et 20 doses minima hémolytiques d'alexine. Nous avons donc procédé au dosage de l'alexine pour les séries B

et D de nos essais et nous avons constaté que l'inhibition porte sur la totalité de l'alexine pour l'expérience de la série B, dans laquelle le sérum inhibant est ajouté immédiatement après l'antigène. Pour l'expérience de la série D, où l'antigène et l'anticorps restent pendant 30 minutes en contact à 37 degrés avant l'addition de sérum inhibant, l'inhibition, très marquée, n'est pas totale. Donc, pour observer les phénomènes d'inhibition dans toute leur intensité, il est nécessaire d'ajouter le sérum inhibant directement sur l'antigène avant le sérum sensibilisant.

D'autre part, nous inspirant du travail publié par J. Bordet et P. Gay dans ces *Annales* (1), où il est indiqué que la dilution des réactifs par l'eau physiologique, au moment de l'addition des hématies et du sérum hémolytique, peut favoriser l'hémolyse, nous avons recherché si cet effet intervient dans l'action inhibante de nos sérums d'animaux hyperimmuns. Nous avons pu constater, par cette méthode, que l'alexine restait fixée, bien que nous ayons employé des hématies fortement sensibilisées. En outre, si l'on diminue la quantité de sensibilisatrice tuberculeuse employée, — ce qui doit revenir à employer une sensibilisatrice moins active —, nous obtenons toujours une fixation très nette. Tout au moins dans nos expériences, l'inhibition caractérisée par une non-fixation de l'alexine n'est donc due ni à la dilution par l'eau physiologique, ni à l'insuffisance de la sensibilisatrice. Nous verrons, d'ailleurs, qu'elle n'est pas influencée par un excès de sérum sensibilisant.

VI

Spécificité de la réaction d'inhibition.

Nous avons étudié, comparativement avec notre sérum de bovidés hyperimmuns, divers sérums normaux ou thérapeutiques (sérums de bovidés sains, sérums antistreptococcique, antidiphtérique, antitétanique, antivenimeux, antipesteux) et nous avons constaté que la propriété inhibante ne se rencontre

(1) 1908, p. 625.

que dans le premier. Il apparaît donc évident que cette propriété est *spécifique*. Elle n'existe, d'ailleurs, pas seulement dans les sérums de nos bovidés hyperimmuns, car nous l'avons trouvée également dans certains échantillons de sérums de chevaux vaccinés qu'ont bien voulu nous envoyer Vallée (d'Alfort) et Rappin (de Nantes).

Chez les bovidés hyperimmunisés à l'Institut Pasteur de Lille par injections intraveineuses répétées de fortes doses de bacilles cultivés sur bile de bœuf (Calmette et Guérin), le pouvoir inhibant du sérum s'accroît immédiatement après les injections de bacilles ; il atteint son maximum après cinq à dix jours, puis s'abaisse sans cependant disparaître tout à fait, même si l'animal reste deux mois au repos.

Les bovidés reconnus tuberculeux à l'abattoir n'ont généralement pas de sérum inhibant. Nous n'en avons trouvé qu'un seul dont l'activité fût manifeste. Ce bovidé, porteur de lésions chroniques très étendues, était, d'ailleurs, en excellent état apparent.

Le sérum des petits animaux de laboratoire (cobayes, lapins), infectés par voie sous-cutanée, ne possède pas non plus de propriétés inhibitrices.

Celles-ci paraissent également être tout à fait exceptionnelles dans le sérum des malades tuberculeux.

VII

Sur quelle substance agit l'inhibitrice ?

Pour élucider cette question, nous avons fait des séries d'expériences en employant :

1° Une dose uniforme d'antigène (0 c.c. 5 de B1 dilué à 1 p. 50) et cinq doses croissantes de sérum de cheval sensibilisant (de 0 c.c. 1 à 0 c.c. 5) ;

2° Les proportions ci-dessus d'antigène et de sensibilisatrices avec, en plus, 0 c.c. 05 de sérum inhibant ;

3° Les mêmes doses de sensibilisatrices avec cinq quantités variables d'antigène (0 c.c. 01 à 0 c.c. 05) ;

4° En plus des sensibilisatrices et de l'antigène mentionnés ci-dessus (3°), une même dose (0 c.c. 05) de sérum inhibant ;

5° 0 c.c. 25 de sérum sensibilisant et cinq doses croissantes d'antigène ;

6° Enfin les mêmes doses de sérum sensibilisant et d'antigène indiquées en 5° avec, en plus, 0 c.c. 05 de sérum inhibant.

Voici, résumée, la première série des expériences indiquées ci-dessus (1°). Les autres sont réalisées d'après le même schéma :

TABLEAU II

Alexine diluée au 1 ½.	0 c.c. 5 d'extrait B1 dilué à 1 p. 50. + sérum sensibilisant :				
—	0 c.c. 1	0 c.c. 2	0 c.c. 3	0 c.c. 4	0 c.c. 5
0 c. c. 1	—	—	—	—	—
0 c. c. 2	—	—	—	—	—
0 c. c. 3	±	—	—	—	—
0 c. c. 4	+	±	±	±	±
0 c. c. 5	+	+	+	+	+

Tous ces essais nous ont montré que l'excès d'antigène seul, à partir de cinq fois la dose employée normalement (0 cent. cube 05 au lieu de 0 cent. cube 01), suffit à masquer l'action du sérum inhibant. *C'est donc sur l'antigène que l'inhibitrice porte son action*, et tous les antigènes tuberculeux peuvent servir à mettre en évidence cette inhibitrice.

Elle masque aussi bien les sensibilisatrices contenues dans les sérums d'espèces étrangères, dans les sérums de même espèce ou dans le sérum même qui la contient. L'inhibition s'affirme d'autant plus intense que la dose de sérum inhibant intervenant dans la réaction est plus considérable.

Nous venons de voir que les sérums inhibants empêchent, même à très faible dose, la réaction de fixation de l'alexine de se produire lorsqu'on les met en présence de sensibilisatrices avec des doses normales de notre antigène B1 (extrait bacillaire aqueux). Les mêmes effets s'observent avec la tuberculine brute de Koch, les bacilles et l'extrait peptoné B2. Pour que la réaction de fixation devienne positive, il faut augmenter considérablement les doses d'antigène.

Nous avons vu, en outre, que notre sérum de bovidé inhibant empêche la fixation de se produire en présence d'un sérum sensibilisant de cheval. Il en est de même si l'on remplace ce dernier par un sérum sensibilisant de chèvre, d'homme ou de bœuf.

Nous savons enfin que les sérums inhibants que nous avons étudiés ne donnent pas la déviation du complément en présence de l'antigène B1 (soluble dans l'eau).

Mais si l'on s'adresse, soit à des corps bacillaires tués et lavés, employés comme antigène (dilution à 5 p. 1.000 de bacilles secs), soit à l'antigène B2 (extrait bacillaire peptoné), une dose de 0 cent. cube 2 de ces antigènes permet toujours de déceler les sensibilisatrices et d'obtenir une réaction positive avec une dose appropriée de sérum. On constate alors que les sérums inhibants renferment eux-mêmes des sensibilisatrices qui sont ainsi démasquées et qu'on peut doser avec précision en variant d'une part les volumes d'antigène employé, d'autre part les quantités de sérum mises en œuvre. Il ne faut pas perdre de vue toutefois que le phénomène d'inhibition apparaît d'autant plus intense que la dose de sérum inhibant intervenant dans la réaction est plus considérable, sans toutefois lui être exactement proportionnelle, ainsi qu'on peut s'en rendre compte à l'examen du tableau III ci-après :

Tableau III.

ALEXINE DILUÉE au 1/4.	0 c.c. 5 EXTRAIT B1 A 1 P. 40 + 0 c.c. 5 SÉRUM SENSIBILISANT + SÉRUM INHIBANT AUX DOSES DE :					
—	0	0 cc. 01	0 cc. 02	0 cc. 03	0 cc. 04	0 cc. 05
0 c.c. 05	—	—	—	—	—	—
0 c.c. 10	—	—	—	—	±	+
0 c.c. 15	—	—	—	±	+	+
0 c.c. 20	—	±	±	+	+	+
0 c.c. 25	—	—	+	+	+	+
0 c.c. 30	—	+	+	+	+	+
0 c.c. 35	±	—	+	+	+	+

VIII

Origine de l'inhibitrice.

On sait que certains sérums de sujets tuberculeux et que les sérums d'animaux hyperimmuns (1) fournissent un précipité au contact de la tuberculine. Nous nous sommes demandé si cette réaction de précipitation intervenait en quelque manière dans le phénomène d'inhibition.

Pour séparer du sérum inhibant employé dans notre expérience les substances précipitables par la tuberculine, il suffit de

(1) *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 8 novembre 1909 et 25 juillet 1910.

faire un mélange dans le rapport de 1 cent. cube de sérum pour 0 cent. cube 125 d'extrait bacillaire aqueux B1. On laisse en contact deux heures à l'étuve et dix-huit heures à la glacière, puis on centrifuge pour séparer le précipité. Le liquide surnageant, additionné d'une nouvelle dose d'extrait bacillaire, ne donne plus aucun louche. Pourtant il conserve sensiblement la moitié de ses propriétés inhibantes : nous nous en sommes assurés par une expérience analogue à celle rapportée dans le tableau précédent.

Un résultat encore plus net s'obtient si l'on traite le sérum inhibant par une tuberculine non antigène (précipitée par l'alcool) ou encore par la malléine qui fournit également un précipité. Le liquide, débarrassé du précipité, conserve presque intégralement sa propriété inhibante.

Il faut donc admettre que la précipitation du sérum par l'antigène ne joue aucun rôle dans la réaction d'inhibition.

Rappelons d'ailleurs que le sérum dit antituberculeux de Ruppel et Rickmann, par exemple, très riche en sensibilisatrices, fournit un précipité abondant avec les diverses tuberculines. Il ne possède cependant aucun pouvoir inhibant.

D'autres expériences nous ont montré qu'un sérum inhibant non chauffé, privé d'alexine par vieillissement, perd, par trois heures de chauffage à 58 degrés, environ 33 p. 100 de l'inhibitrice qu'il contenait. Ce même sérum, mélangé après chauffage à l'extrait bacillaire, ne fournit plus que 31 p. 100 du précipité qu'on pouvait en séparer par centrifugation lorsqu'il était mélangé, non chauffé, à l'antigène.

La précipitation par l'eau distillée (1) (avec isotonisation subséquente) conduit à un résultat moins net : on n'obtient plus, par l'extrait bacillaire, que 42 p. 100 du précipité que fournit le sérum normal et 50 p. 100 de l'inhibitrice contenue dans le sérum non traité. La précipitation par l'extrait B1, qui fait baisser le pouvoir inhibant de 50 p. 100 dans le liquide décanté, devient moins nocive pour l'inhibition si l'on ne sépare pas le précipité.

Une partie de l'inhibitrice est donc entraînée par les précipités produits dans un sérum inhibant.

(1) *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 25 juillet 1910.

On pouvait encore se demander si la réaction d'inhibition ne résultait pas de la présence dans le sérum d'un excès de sensibilisatrices.

Or, le sérum de Ruppel et Rickmann, le plus riche en sensibilisatrices que nous ayons eu entre les mains, n'est jamais inhibant, quelle que soit la dose qu'on fasse intervenir en présence d'une même quantité d'antigène. Et d'autre part, on constate, comme nous l'avons déjà dit, que les sérums inhibants ne libèrent les sensibilisatrices qu'ils renferment à côté de l'inhibitrice, quelque minime que soit la dose à laquelle on les emploie, que lorsqu'on les met en présence d'une dose élevée (environ trois fois supérieure à celle qu'exige le sérum de Ruppel et Rickmann) d'un antigène approprié, tel que notre antigène peptoné B2. C'est donc que la fixation de l'alexine ne peut se produire, par l'effet des sensibilisatrices sur l'antigène, que lorsque toute la substance inhibante a été saturée par cet antigène.

L'action combinée de la dilution par l'eau distillée et d'un courant d'anhydride carbonique (*méthode de Liefmann*) sur un sérum inhibant (1) peut d'ailleurs nous permettre de séparer l'inhibitrice des sensibilisatrices.

Dans un sérum de bovidé inhibant inactivé à 58 degrés, dilué avec neuf volumes d'eau distillée, nous faisons passer un courant d'anhydride carbonique. Après un repos de deux heures et centrifugation, on décante le liquide qu'on isotonise. On reprend par l'eau salée physiologique l'abondant précipité formé.

Voici les poids de précipité sec que fournissent divers sérums à la dose de 1 cent. cube :

Sérum de *bovidé inhibant*	0 gr. 0225
Sérum de *bovidé sain*	0 gr. 00875
Sérum de *Ruppel et Rickmann*	0 gr. 0125
Sérum antivenimeux	0 gr. 008
Sérum de cheval agglutinant le bacille typhique	0 gr. 009
Sérum d'homme sain	0 gr. 005
Sérum de cobaye sain	0 gr. 00375

Le sérum de bovidé inhibant précipite donc beaucoup plus que le sérum d'un bovidé sain. Des expériences conduites

(1) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 26 juillet 1913.

comme celles du tableau III nous ont permis de rechercher les pouvoirs inhibants du liquide, du précipité, du mélange reconstituant le sérum initial et de les comparer au pouvoir inhibant de ce dernier. On constate ainsi que le liquide décanté ne possède pas de pouvoir inhibant ; le précipité au contraire se montre aussi actif que le sérum dont il provient. Le précipité du sérum de Ruppel et Rickmann, ou d'un sérum de bovidé sain, n'atténue pas la fixation. La *réaction est donc spécifique*.

La recherche des sensibilisatrices dans les diverses fractions du sérum fournit un résultat négatif avec l'antigène B1. Avec l'antigène B2 on constate que le précipité retient de faibles traces de sensibilisatrices ; au contraire le liquide décanté, même employé en grand excès, donne une fixation très nette qui ne s'atténue pas : il n'est donc pas inhibant. Pour faire réapparaître l'inhibition, il suffit d'incorporer le précipité au liquide décanté.

De plus, si l'on fait une réaction de fixation avec l'antigène B2 et du liquide décanté, ou du sérum initial, on observe que, pour obtenir une déviation égale avec le liquide décanté, il faut environ trois fois moins d'antigène qu'avec le sérum (caractère distinctif des sérums sensibilisants et des sérums inhibants).

Ajoutons que les précipitines se retrouvent avec l'inhibitrice dans le précipité, tandis que les agglutinines restent avec les sensibilisatrices dans le liquide décanté. L'inhibitrice est donc bien distincte des sensibilisatrices. Ces dernières sont aussi, par suite, distinctes des précipitines.

IX

Fonction de l'inhibitrice.

Comment expliquer la formation de cette substance inhibante dans le sang des animaux hyperimmuns et son absence habituelle dans le sang des tuberculeux?

Nous ne pouvons formuler à cet égard qu'une hypothèse : c'est que chez les animaux qu'on immunise au moyen d'injections intraveineuses massives de bacilles tuberculeux plus ou moins modifiés ou virulents, ces bacilles, se trouvant immédiatement sensibilisés par une surabondance de sensibilisa-

trices, provoquent un enrichissement du sang en globulines (ainsi qu'on le constate d'ailleurs par ce fait que le sérum, même chauffé à 58 degrés, forme un important précipité de globulines lorsqu'on le traite par la méthode de Liefmann). Or, ces globulines, qui contiennent l'inhibitrice comme nous l'avons montré, ont la propriété d'empêcher la fixation de l'alexine sur les antigènes sensibilisés et de s'opposer même à l'agglutination.

On sait (1) que les bacilles tuberculeux, mis en contact *in vitro* avec du sérum frais de cobaye, peuvent fournir après centrifugation un produit (anaphylotoxine) toxique par injection intraveineuse pour le cobaye sain. Si les bacilles sont sensibilisés, la formation du poison, qui s'accompagne d'une chute du pouvoir alexique, est encore plus facile à obtenir et exige une plus faible quantité de bacilles. Dans l'hypothèse que l'injection de bacilles dans les veines d'animaux sensibilisés par des injections antérieures peut produire de l'anaphylotoxine (l'on a déjà vu des accidents mortels au cours des immunisations par injections intraveineuses, évitables souvent par le procédé des vaccinations subintrantes de Besredka), on peut penser que l' « inhibitrice », qui s'oppose à la fixation de l'alexine, concourt ainsi à empêcher la formation d'anaphylotoxine, laquelle est liée à la baisse du pouvoir alexique (J. Bordet, Mutermilch). Il est bon de faire remarquer que nous n'avons pas encore pu faire la preuve de ce fait par une expérience directe, car le sérum inhibant de *bovidé* dont nous disposons est toxique pour le cobaye à une dose pour laquelle l'inhibition est insuffisamment marquée. Nous pensons toutefois que les inhibitrices exercent dans l'organisme une action protectrice ou défensive au regard des injections intraveineuses et des infections bacillaires massives. Cette opinion semble justifiée par le fait que, si l'on cesse d'injecter des bacilles aux animaux hyperimmuns, on constate un abaissement du pouvoir inhibant de leur sérum.

1) E. Friedberger et E. Goldschmidt, *Zeits. für Immunitätsf*, 24 avril 1911.

Conclusions générales.

1° On constate dans les sérums d'animaux hyperimmuns la présence d'une nouvelle propriété *inhibitrice* qui s'oppose à la réaction de Bordet-Gengou.

2° La mise en évidence de cette propriété se fait très facilement si l'on a soin d'ajouter le sérum inhibant à l'antigène avant l'anticorps et l'alexine. L'inhibition se produit encore, quoique très atténuée, tant que l'alexine n'a pas été en contact prolongé avec le complexe antigène + anticorps. Quand l'alexine est fixée, l'inhibitrice ne peut plus la remettre en liberté. Si le sérum inhibant est ajouté directement à l'antigène, l'inhibition est totale.

3° L'inhibitrice porte son action sur l'antigène : un excès de ce dernier l'entrave.

4° L'inhibition augmente avec la dose de sérum inhibant. Elle se manifeste en présence des sensibilisatrices de nombreux sérums et vis-à-vis de tous les antigènes tuberculeux. Elle masque les sensibilisatrices que renferme lui-même le sérum inhibant.

5° Pour déceler les sensibilisatrices des sérums inhibants il suffit d'employer des doses élevées de bacilles, de tuberculine de Koch ou de notre antigène B2. L'inhibitrice est décelée par tous les antigènes que nous avons étudiés.

6° La propriété inhibitrice d'un sérum est indépendante et distincte des sensibilisatrices et des précipitines que renferme ce même sérum.

7° Nous pensons que l'inhibitrice remplit un rôle défensif pour l'organisme en empêchant la formation d'anaphylotoxine après les injections massives intraveineuses. Sa valeur diagnostique est nulle.

MÉNINGITE PAR INJECTION DE MICROBES PYOGÈNES DANS LES NERFS PÉRIPHÉRIQUES

par C. LEVADITI, V. DANULESCO et L. ARZT

(Avec la Planche XII.)

I

Certains virus invisibles et filtrants, jouissant d'une affinité marquée pour le système nerveux central, atteignent le cerveau et la moelle lorsqu'on les introduit dans les nerfs périphériques ; tels sont, en particulier, le virus de la rage et celui de la poliomyélite. En ce qui concerne ce dernier, les recherches de Flexner et Lewis (1), de Landsteiner et Levaditi (2) et de Leiner et Wiesner (3) ont montré que le microbe de la paralysie infantile, injecté dans un nerf périphérique, engendre la maladie ; sa marche le long du nerf inoculé est démontrée, en premier lieu, par le fait que les phénomènes paralytiques débutent par le membre correspondant au tronc nerveux injecté ; en second lieu, par l'absence de toute paralysie lorsqu'on a soin de sectionner ce tronc nerveux au-dessus du point inoculé. Malheureusement, comme il s'agit là de virus invisibles, il est impossible de suivre au microscope le chemin parcouru par le microbe pour atteindre le système nerveux central. Or, au cours de nos expériences sur la poliomyélite (Levaditi et Danulesco), *nous avons réussi à provoquer chez le singe une méningite aiguë microbienne, en injectant le matériel infectieux dans les nerfs médians* (4). Cette méningite était due à un diplocoque cultivable et facile à mettre en évidence sur frottis et sur coupes, nous avons pu suivre la marche du

(1) Flexner et Lewis, *Journ. of the americ. med. Assoc.*, 1909, 4 décembre.

(2) Landsteiner et Levaditi, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1909, 18 décembre.

(3) Leiner et Wiesner, *Wiener klin. Woch.*, 1910, n° 3.

(4) Levaditi, Danulesco et Arzt, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1912, t. LXXII, p. 1078.

microbe le long des nerfs vers la région correspondante de la moelle, à travers les ganglions rachidiens.

Tout en tenant compte des phénomènes qui existent entre le diplocoque en question et les virus de la rage et de la poliomyélite, au point de vue de la nature et de la localisation des lésions, nos constatations nous paraissent intéressantes, attendu qu'elles rendent visible cette marche des microbes le long des nerfs.

La question de la propagation des processus toxi-infectieux le long des nerfs, de la périphérie vers les centres (névrites ascendantes), suivie ou non de méningite, a été déjà examinée maintes fois, tant au point de vue clinique qu'expérimental. Parmi les anciens auteurs, Lepelletier (1), en 1820, a soutenu, à la suite de l'examen anatomique d'un cas de tétanos traumatique, que l'inflammation d'un nerf périphérique (dans son cas le cubital et le médian) peut se propager le long des filets nerveux à la pie-mère et à l'arachnoïde. La même opinion est avancée par Gull et partagée, au point de vue clinique, par V. Leyden. Si, de nos jours, Oppenheim et Strümpell, sans nier l'existence des névrites ascendantes d'origine traumatique, considèrent le processus comme exceptionnel, par contre, d'autres auteurs ont publié d'assez nombreuses observations qui mettent hors de doute la fréquence relative de cette forme particulière de névrite. Ainsi, Balten (2) relate cinq cas incontestables de névrite infectieuse ascendante, ayant, comme point de départ, un traumatisme périphérique. De son côté, Köster (3) a rassemblé 38 observations de névrite ascendante due à un phlegmon (2 cas), à des furoncles (1 cas), à des traumatismes des doigts (15 cas), à des lésions traumatiques de la main, du poignet, de l'épaule, du pied, etc. Lui-même relate trois observations personnelles, concernant des traumatismes de la main, compliqués de suppuration et suivis de signes de névrite. Enfin, Brissaud et Gougerot (4) publient un cas de névrite ascendante consécutive à une plaie du pouce.

(1) Cité d'après Köster, *Fortschritte der Medizin*, 1910, t. XXVIII, n° 48, p. 1505.

(2) Balten, *Berliner klin. Woch.*, n° 39, 1908.

(3) *Loc. cit.*

(4) Brissaud et Gougerot, *Revue neurologique*, 1908, n° 13.

Ces faits, pour la plupart cliniques, sont confirmés par certaines constatations anatomiques et par l'expérimentation. Ainsi, Bittner (1) a eu l'occasion d'observer trois cas d'arthrite inflammatoire aiguë de l'articulation coxo-fémorale chez des nourrissons, provoquée par une association de staphylocoques et de streptocoques. Dans deux de ses cas, la maladie a été suivie d'une méningite cérébro-spinale due au streptocoque et diagnostiquée par l'examen du liquique céphalo-rachidien et la necropsie. Or, dans l'un de ces cas, Sternberg a pu suivre la marche du processus inflammatoire le long du nerf sciatique jusqu'aux méninges médullaires; il s'agissait d'une névrite purulente provoquée par le streptocoque (2).

Il paraît donc certain que *les lésions traumatiques, surtout lorsqu'elles se compliquent d'une infection locale, peuvent être suivies d'une névrite ascendante et parfois d'une méningite cérébro-spinale consécutive.* L'expérience confirme-t-elle ces données cliniques et anatomiques?

Nous n'insisterons pas ici sur les essais faits par Tiesler, Feinberg, Niedick, sur les lapins et les chats et qui semblent confirmer l'existence des névrites ascendantes toxiques et infectieuses. Nous rappellerons surtout les recherches de Homen et Laitinen (3), qui sont en étroite relation avec les nôtres. Ces auteurs ont expérimenté sur le lapin et ont inoculé dans les nerfs sciatiques quelques gouttes d'une culture de streptocoque très virulente pour cette espèce animale. Ils ont constaté, par le procédé des cultures et celui des coupes, que l'infection, partie du point d'inoculation, se propageait non seulement de bas en haut, mais aussi vers la périphérie du nerf. Le processus infectieux et inflammatoire suit les espaces lymphatiques des troncs nerveux. Déjà, à quelques centimètres du point d'injection, on ne trouve plus de microbes dans l'espace épinévral; ceux-ci sont localisés au centre, dans les fentes lymphatiques. La pénétration dans les méninges se fait le plus souvent le long des racines postérieures et la méningite débute dans la région lombaire. De là, l'infection suit une marche

(1) Bittner, *Wiener klin. Woch.*, 1912, n° 12.

(2) Cf. pour la littérature des méningites à la suite des traumatismes périphériques, Levy, *Beitr. klin. Chirurgie*, 1899, t. XXIII.

(3) Homen et Laitinen, Ziegler's, *Beitr. zur patholog. Anatomie*, 1899.

ascendante et se termine par une inflammation généralisée des méninges. D'après Homen et Laitinen, les éléments propres de la moelle se ressentent de l'inoculation du streptocoque dans le sciatique : le processus s'y propage soit le long du septum postérieur, soit par les gaines lymphatiques péri-vasculaires.

Enfin, *les ganglions rachidiens sont rarement pris*, malgré l'envahissement des méninges médullaires le long des racines postérieures; on n'y décèle que des lésions dégénératives des cellules nerveuses.

Les recherches expérimentales de Homen et Laitinen prouvent donc que, chez le lapin, l'introduction de streptocoques virulents dans le nerf sciatique produit une névrite infectieuse ascendante et que le virus, se propageant le long des espaces lymphatiques du nerf, atteint les méninges et provoque une méningite cérébro-spinale. Or nos expériences, faites sur le singe, ont fourni des résultats qui concordent avec les précédents; les voici :

II. — Etude expérimentale

Exp. I. — *Macacus cynomolgus* n° 91, atteint de poliomyélite, est sacrifié; ses amygdales servent à préparer une émulsion dans de l'eau salée, émulsion que l'on injecte, à la dose de 0 cent. cube 5 dans les deux *nerfs médians* du *Macacus rhesus* n° 303 (1). Nous avions fait cette inoculation dans le but de rechercher le virus de la paralysie infantile dans les amygdales des animaux paralysés. Trois jours après l'opération, l'animal se sert mal de son bras gauche, qui paraît parésié; il tient sa main gauche dans la droite. Le lendemain, on le trouve abattu, courbé sur lui-même. Vers le soir, il est pris de convulsions, présente du nystagmus et une déviation des yeux vers la gauche, contracte le côté gauche de la face; les convulsions s'accompagnent de salivation. La crise convulsive dure une quinzaine de minutes; le singe se relève ensuite, mais reste paralysé des membres supérieurs.

Même état le 5e jour. L'animal est sacrifié, et à la nécropsie on constate une congestion intense des méninges, surtout à la base, des stries blanchâtres le long des vaisseaux de l'écorce cérébrale (région rolandique), une hyperémie de la substance grise corticale. Sur les *frottis* des méninges, on décèle de nombreux polynucléaires et des coccus disposés deux par deux, prenant le Gram, entourés d'une légère capsule. Ces diplocoques ont été cultivés et voici les caractères des cultures :

Sur gélose au sang : colonies isolées, transparentes, assez discrètes; sur *bouillon* : trouble uniforme. Les microbes sont disposés en diplo et aussi en courtes chaînettes. D'après l'aspect morphologique et les caractères des

(1) Section de la peau à la face interne du bras, isolement du nerf, injection de l'émulsion dans le tronc nerveux même, suture.

cultures, le microbe appartient au groupe du *pneumocoque*. Le pneumocoque existe d'ailleurs fréquemment chez le singe et provoque parfois des septicémies mortelles. Toutefois, la virulence de nos cultures pour la souris était faible ou nulle.

Exp. II. — Des fragments de l'écorce cérébrale et de moelle sont triturés avec de l'eau salée, et l'émulsion sert à inoculer dans les *deux nerfs médians* le *Macacus rhesus* n° 304. Le 4e jour, l'animal, jusqu'alors bien portant, tient la tête penchée, titube lorsqu'il essaye de se déplacer. De temps en temps il fait des mouvements latéraux avec la tête. Le 5e jour, on le trouve couché, mais non paralysé. Irritabilité très accusée, convulsions toniques, avec déviation des yeux vers la gauche.

Le 6e jour, le singe est mourant; on le sacrifie. Mêmes constatations à la nécropsie, avec, en plus, un état congestif des méninges médullaires, au niveau du point d'émergence des nerfs du plexus brachial. Sur les *frottis* faits avec le liquide céphalo-rachidien, on constate le même diplocoque, le plus souvent inclus dans les leucocytes polynucléaires. Le diplocoque a pu être cultivé des méninges cérébrales et du sang du cœur.

Exp. III. — Nous avons inoculé, avec des cultures pures de ce diplocoque, le *Cynomolgus* n° 313 et le *Rhesus* n° 0, *dans les nerfs médians*, et le *Cynomolgus* n° 314, dans le *cerveau* (0 c. c 6). Seul, l'animal injecté dans le cerveau a été pris de méningite, le 2e jour; les autres n'ont montré aucun trouble apparent. D'un autre côté, un singe (*Cynomolg.* n° 314), ayant reçu dans les veines 0 c. c. 5 de culture en bouillon, a parfaitement supporté l'inoculation.

Ces expériences montrent que *l'inoculation de matériaux virulents (amygdale de singe) dans le nerf médian a provoqué chez le singe une méningite aiguë, apparaissant le 3e jour; cette méningite était due à un diplocoque prenant le Gram et facilement cultivable (pneumocoque)*. Le virus prélevé sur les méninges du premier animal et inoculé dans les nerfs médians d'un second singe a engendré également la méningite. Par contre, la culture, par suite d'une perte rapide de la virulence, s'est montrée incapable de reproduire la méningite par injection soit dans les nerfs, soit dans la circulation générale; seule l'inoculation intracérébrale a été suivie de succès.

III. — Étude histologique.

Au niveau du *point d'inoculation*, on constate, chez le premier singe (*Rhesus* 303 (Pl. XII, fig. 1)), des abcès microscopiques dans les faisceaux nerveux; ceux-ci sont dissociés par des leucocytes polynucléaires, en partie dégénérés et on décèle des microbes dans l'exsudat. Le tissu conjonctif qui entoure les troncs nerveux du plexus est enflammé. Dans le plexus du second singe (*Rhesus* 304), les altérations inflammatoires sont

moins accusées au centre des troncs nerveux que dans le tissu conjonctif qui entoure ces troncs ; certains des faisceaux nerveux sont entourés d'une véritable gaine de leucocytes dégénérés. L'inflammation microbienne se poursuit le long des racines postérieures, vers les ganglions rachidiens correspondants (Pl. XII, fig. 3) ; elle est représentée par des traînées d'infiltration leucocytaire, disposées entre les fibres nerveuses. Au niveau même des *ganglions rachidiens* (Pl. XII, fig. 2) on constate une intégrité totale des cellules ganglionnaires. Tandis que dans la poliomyélite, comme d'ailleurs dans la rage, ces cellules sont altérées, parfois dissociées par des éléments migrateurs et entourées de foyers d'inflammation mononucléaires, chez nos singes l'infiltration à polynucléaires s'arrête à l'entrée des racines, côtoie la zone cellulaire du ganglion et n'envahit les racines qu'en cheminant le long du tissu conjonctif péri-ganglionnaire. Les coupes de *cerveau* (Pl. XII, fig. 4 et 6) montrent un état œdémateux des méninges et une infiltration à polynucléaires de la pie-mère, infiltration qui se propage le long des fentes qui séparent les circonvolutions et qui entoure aussi certains vaisseaux de la région la plus superficielle de la substance grise. Mêmes lésions de méningite aiguë au niveau de la moelle cervicale et lombaire (Pl. XII, fig. 5).

Les diplocoques peuvent être décelés sur coupes là où il y a des foyers d'infiltration : plexus brachial, racines, tissu conjonctif péri-ganglionnaire et méninges. Les lésions les plus intéressantes sont celles des faisceaux nerveux des racines : les fibrilles nerveuses montrent une segmentation nette de la myéline et une hypertrophie des noyaux des cellules de la gaine de Schwann. Les diplocoques se trouvent soit entre les fragments de myéline, soit inclus dans le protoplasma des cellules de la gaine de Schwann.

IV. — Conclusions.

Nos expériences, conformes à celles de Homen et Laitinen, montrent que *certains microbes pyogènes peuvent engendrer des lésions de méningite cérébro-spinale aiguë, lorsqu'on les introduit dans les troncs nerveux périphériques* (*N. médian*), *chez le singe*. Cette méningite est précédée d'une névrite ascendante

inflammatoire et dégénérative. Le virus suit les espaces lymphatiques qui séparent les fibres nerveuses et aussi le tissu conjonctif péri-nerveux. Tout en suivant cette voie centripète le long des racines postérieures, il contourne la zone des cellules nerveuses des ganglions rachidiens, qu'il laisse presque intacte. Il réussit ainsi à atteindre les méninges rachidiennes, s'y multiplie, provoque une diapédèse intense, presque exclusivement polynucléaire, et engendre ainsi la méningite, tout d'abord spinale, ensuite cérébro-spinale. Comme dans la généralité des méningites aiguës infectieuses, le virus et l'inflammation ne se cantonnent pas aux méninges proprement dites; la réaction inflammatoire envahit la moelle et la corticalité cérébrale, se propageant le long des septums et des gaines lymphatiques péri-vasculaires.

Mais là où apparaît de la façon la plus nette la différence entre le mode d'action des microbes pyogènes et des virus filtrants à affinité nerveuse spécifique (rage, poliomyélite), c'est lorsqu'on examine les lésions au niveau *des ganglions rachidiens*. Le virus de la rage et de la paralysie infantile cheminent eux aussi le long des nerfs périphériques, pour atteindre ultérieurement les ganglions spinaux et la moelle, s'y multiplier et engendrer des lésions. Mais, comme ils jouissent précisément de cette affinité spécifique pour les cellules nerveuses en général et les cellules ganglionnaires en particulier, ils s'attaquent à ces cellules ganglionnaires dès qu'ils les rencontrent dans leur chemin vers la moelle. De là les lésions intenses des cellules des ganglions spinaux, constatées dans la poliomyélite et la rage et dont la constance justifie leur valeur en ce qui concerne le diagnostic anatomique de ces maladies. Les microbes pyogènes semblent se comporter de toute autre manière. Si, à l'exemple des virus rabique et poliomyélitique, ils cheminent eux aussi le long des nerfs périphériques et atteignent ainsi les méninges médullaires, par contre ils laissent intactes les cellules des ganglions spinaux. L'inflammation contourne ces cellules et, malgré le voisinage des microbes et des lésions diapédétiques, ces cellules ne montrent ni des signes intenses de dégénérescence, ni la neurophagie leucocytaire que l'on constate dans la rage, et surtout dans la paralysie infantile.

Cette différence frappante dans le mode d'action de ces deux catégories de microorganismes, *microbes pyogènes* et *virus filtrants neurotropes*, ne peut s'expliquer que par l'affinité de ces derniers pour les éléments nobles du système nerveux. Avec Landsteiner (1), nous avons insisté, dès le début de nos recherches expérimentales sur la poliomyélite, sur cette *affinité spécifique neurotrope du virus de la paralysie infantile*, et nous l'avons invoquée pour expliquer la genèse des altérations histopathologiques qui caractérisent la maladie. Les recherches expérimentales que nous venons d'exposer constituent une preuve de plus en faveur de notre hypothèse.

En outre, elles permettent de préciser la pathogénie des altérations médullaires dans la paralysie infantile expérimentale provoquée par l'introduction du virus dans le cerveau. On sait que l'inoculation intra-cérébrale de ce virus, chez le singe, ne provoque jamais d'encéphalite; la maladie débute le plus souvent par des paralysies localisées aux membres inférieurs, par une véritable myélite lombaire. Comment se fait-il que le microbe déposé dans le cerveau ne commence pas par léser les régions médullaires avec lesquelles il se trouve tout d'abord en contact et se porte, au contraire, sur des segments nerveux éloignés? Il nous semble que les expériences sus-citées et les déductions qui en découlent nous fournissent la clef de ce problème.

En effet, Flexner et Lewis (2) ont établi que, peu de temps après l'inoculation du virus dans le cerveau, tout au début de la période d'incubation, ce virus se retrouve dans le liquide céphalo-rachidien, où il n'a d'ailleurs qu'une existence éphémère, attendu que ce liquide, examiné plus tard, alors que la maladie bat son plein, n'est plus virulent. Il est probable, selon nous, que le germe, déposé dans le cerveau, commence par envahir le liquide céphalo-rachidien et atteint ainsi les parties déclives de l'espace sous-arachnoïdien. Là, il rencontre les racines postérieures de la région sacrée, pénètre dans ces racines et, par l'intermédiaire des espaces lymphathiques intraradiculaires, peut-être aussi le long des cylindraxes, il atteint les

(1) Landsteiner et Levaditi, *Annales de l'Institut Pasteur*, novembre 1910, p. 833.

(2) Flexner et Lewis, *Journal of the americ. med. Assoc.*, 1910, t. LIV, n° 22.

cellules nerveuses des ganglions spinaux. Par suite de l'*affinité neurotrope* dont nous venons de parler, le microbe envahit ces cellules, s'y multiplie et y provoque des lésions (dégénérescence et neuronophagie). Le même chemin lui sert pour pénétrer dans la substance grise de la moelle lombaire, où il ne tarde pas à engendrer cette poliomyélite à type inférieur, si commune chez les singes infectés par la voie cérébrale. A cette poliomyélite lombaire succède l'ascension progressive du virus et des lésions vers les centres supérieurs, qui se traduit cliniquement par le *syndrome de Landry*.

C'est là une explication qui nous paraît suffisamment plausible et en accord avec les faits, pour qu'elle mérite d'être signalée ici.

LÉGENDE DE LA PLANCHE

Fig. 1. — *Coupe de nerf médian, un peu au-dessus du point d'inoculation* (*Rhesus* n° 303, voy. observation, p. 359). Hématoxyline-éosine. *c*, tissu conjonctif péri-névrique ; avec *v*, vaisseau sanguin ; *n*, coupe de faisceaux nerveux ; *a*, abcès à diplocoque au milieu d'un faisceau nerveux : *b*, inflammation et abcès dans le tissu conjonctif qui sépare les deux faisceaux nerveux.

Fig. 2. — *Coupe de ganglion rachidien correspondant aux racines du nerf médian inoculé* (*Rhesus* n° 304), *t*, tissu conjonctif; *c*, cellules nerveuses; *i*, foyer inflammatoire au voisinage immédiat de la zone cellulaire, mais ne pénétrant pas dans cette zone (Cf. fig. 3, *p*). Même coloration.

Fig. 3. — *Coupe du même ganglion à l'entrée des racines du nerf médian inoculé*. *r*, racines; *z*, zone cellulaire du ganglion; *i*, inflammation le long du tissu conjonctif que séparent les faisceaux nerveux : *i*, traînée inflammatoire au milieu d'une racine ; *s*, petit foyer leucocytaire entre les fibres nerveuses de la racine *r* ; *p*, zone inflammatoire au voisinage des cellules nerveuses. Même coloration.

Fig. 4. — *Coupe de l'écorce cérébrale* (*Rhesus* n° 304). Bleu de polychrome. *m*, méningite à polynucléaires (*p*) et à mononucléaires (plus rares, *d*) ; *v*, vaisseau sanguin; *s*, *diplocoques*; *n*, cellule nerveuse ; *c*, cerveau ; *i*, infiltration de la surface cérébrale par des polynucléaires.

Fig. 5. — *Coupe de moelle cervicale* (*Rhesus* n° 304). *m*, moelle (cordons postérieurs) ; *s*, septum postérieur ; *r*, racines postérieures ; *i*, foyer de méningite. Hématoxyline-éosine.

Fig. 6. — *Coupe de cerveau* (*Rhesus* n° 304). *c*, cerveau ; *f*, méningite ; *v*, vaisseau sanguin. Hématoxyline-éosine.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE SUR LA CÉNUROSE DU LAPIN

par

A. HENRY,
Chef de Travaux
à l'École vétérinaire d'Alfort.

A. CIUCA,
Chef de Travaux,
à l'École vétérinaire de Bucarest.

(Travail des laboratoires de M. Railliet, à l'École d'Alfort, et de M. Weinberg, à l'Institut Pasteur.)

Il existe chez le Lapin une maladie parasitaire spontanée, la *cénurose*, qui, par plus d'un point, ressemble à l'échinococcose de l'Homme et des animaux. Les deux affections sont causées par des formes larvaires de Ténias qui s'enkystent dans les tissus; dans l'échinococcose, les kystes parasitaires se logent de préférence dans les organes profonds; dans la cénurose, ils se localisent surtout dans le tissu conjonctif intermusculaire et sous-cutané.

Nous nous sommes proposés de rechercher si le sérum des Lapins porteurs de Cénures présente les mêmes propriétés biologiques que celles qui ont été trouvées pour celui des porteurs d'Échinocoques. Nos prévisions ont été confirmées, et les résultats de nos premières recherches ont été résumés dans trois notes présentées à la Société de Biologie (1).

Nous avons voulu compléter nos premières recherches, et établir exactement dans quelles conditions apparaissent certaines propriétés biologiques du sérum dans la cénurose. Nous nous sommes cependant heurtés à une grande difficulté : pénurie de Lapins à cénurose spontanée. Pour obvier à cet inconvénient, nous avons essayé de reproduire expérimentalement cette maladie. Après quelques insuccès, nous sommes arrivés à élaborer une technique qui nous a permis de reproduire cette affection parasitaire chez la moitié des animaux en expérience.

(1) Henry et Ciuca, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, séance du 15 juin 1912, p. 983; séance du 21 décembre 1912, p. 735; séance du 4 janvier 1913, p. 14.

Nous croyons donc utile, avant d'entrer dans l'exposé de nos recherches sérologiques, de donner ici une description sommaire, basée en grande partie sur nos observations personnelles, du *Tænia serialis*, de sa forme larvaire, ainsi que de la technique à suivre dans les expériences de reproduction expérimentale de la cénurose.

I. REPRODUCTION EXPÉRIMENTALE DE LA CÉNUROSE CHEZ LE LAPIN

Sans vouloir rappeler l'histoire complète de ce Cestode, il nous faut cependant exposer les éléments essentiels de sa morphologie et de son évolution, dont la connaissance est indispensable à qui voudra se procurer, expérimentalement, le matériel nécessaire aux recherches.

Le *Cœnurus serialis*, qui s'observe principalement chez le Lapin, est l'état larvaire ou cystique du *Tænia serialis*, vivant dans l'intestin du Chien. Nous envisagerons successivement ces deux formes, en commençant par l'adulte.

Tænia serialis Baillet, 1863.

Voici, d'après les classiques, les caractères principaux de ce Ténia :

Ver long de 45 à 72 centimètres. Scolex globuleux, tétragone, large de 850 à 1.300 μ; rostre saillant, armé d'une double couronne de 26 à 36 (ordinairement 30-32) crochets, dont la lame est très pointue et assez fortement arquée en griffe; les grands sont longs de 135 à 157 μ, à manche relativement grêle et ondulé : les petits mesurent de 85 à 112 μ de longueur; leur manche est court, leur garde manifestement bilobée. Cou assez long. Chaîne formée d'environ 150 anneaux, les derniers, longs de 8 à 16 millimètres, larges de 3 à 4 millimètres et à angles postérieurs très saillants dans les anneaux libres. Embryophores sphériques ou légèrement ellipsoïdes, mesurant 33 à 41 μ de diamètre.

Le *Tænia serialis* se fixe dans la moitié postérieure de l'intestin grêle du Chien; on l'y rencontre presque toujours en colonie nombreuse, ce qui tient à ce que l'ingestion d'un Cénure introduit dans le tube digestif un grand nombre de scolex à la fois.

Le *T. serrata* et le *T. marginata*, beaucoup plus communs, se fixent, au contraire, dans les premières zones de l'intestin grêle, rarement en arrière du premier tiers, et les individus, d'ailleurs de taille supérieure ($0^{m}50$ à 2 mètres), sont généralement peu nombreux.

Quand on recherche le *T. serialis* dans les autopsies, il y a là un élément de diagnostic différentiel qu'il ne faut pas négliger.

Par contre, une espèce voisine, le *T. cœnurus* (dont la larve est le *Cœnurus cerebralis*, qui occasionne le « tournis » du Mouton), se fixe dans l'intestin grêle du Chien dans des conditions absolument identiques à celles de l'espèce qui nous occupe, et comme la morphologie de ces deux vers est à peu près semblable, il y a quelque difficulté à les différencier d'emblée. Mais la distinction se fera à coup sûr par l'examen attentif des crochets — forme et dimensions — et, au besoin, par la comparaison de ceux-ci avec des préparations types.

Cependant, le moyen le plus sûr d'obtenir le *Tænia serialis*, qui doit servir de base expérimentale, est de faire ingérer à un Chien non infecté un Cénure du Lapin domestique ou du Lapin de garenne, parasite dont l'identité ne prête jamais à confusion. Les scolex des Cénures offrent l'avantage de conserver leur vitalité plusieurs jours après la mort de l'hôte; on peut ainsi se procurer à distance la source d'infestation, qu'il n'est pas toujours possible de trouver sur place.

Le Chien contracte très facilement le *Tænia serialis*; on peut même dire qu'il est exceptionnel d'avoir un échec.

Pour atteindre son complet développement, le Ténia demande environ six semaines, temps au bout duquel apparaissent à la surface des excréments une multitude de proglottis très mobiles qui, si on ne les recueille pas tout de suite, ne tardent pas à s'éparpiller aux alentours. Pendant leurs pérégrinations, la plupart d'entre eux laissent échapper sinon la totalité, du moins une grande partie de leurs œufs. C'est une particularité qu'il est bon de ne pas oublier; car si, partant de ces proglottis, on veut obtenir le développement expérimental du Cénure chez le Lapin, il faut avoir soin de choisir ceux d'entre eux qui contiennent encore des œufs; un simple examen par transparence permet, sans difficulté, un triage rapide.

Nous n'avons aucune donnée précise sur la durée de la vie du *T. serialis*; forcément elle doit être variable suivant les conditions du milieu intestinal. Assez souvent, après une expulsion de paquets de Ténias, on peut croire perdue la source que l'on entretient, mais presque toujours un bon nombre de scolex restent adhérents à la muqueuse, et, après un temps nécessaire à la reconstitution des strobiles, les proglottis réapparaissent presque aussi nombreux qu'à l'origine. Après plusieurs expulsions partielles ou en masse, le Cestode finit cependant par disparaître, mais toujours assez tardivement pour permettre de poursuivre toute une série d'expériences.

Au surplus, en faisant ingérer périodiquement au Chien quelques-uns des Cénures obtenus, on peut entretenir indéfiniment le matériel expérimental.

Cœnurus serialis P. Gervais, 1845.

Le *Cœnurus serialis* (ou *Multiceps serialis*) se présente, à l'état de complet développement, sous la forme d'une vésicule plus ou moins régulièrement sphérique ou ovoïde, de la grosseur d'une noix à celle d'une petite pomme, formée d'une paroi fine et transparente et d'un contenu liquide limpide; à travers la membrane on aperçoit, appendus à sa face interne, de nombreux corps blanchâtres, longs de 2 à 3 millimètres, épais de 1 millimètre environ, qui renferment chacun un scolex invaginé au fond d'une cavité à parois fortement plissées. Fréquemment, les corps en question paraissent groupés en une ou plusieurs séries ou bandes linéaires; c'est à cette disposition particulière qu'est dû le qualificatif de *sérial* donné à l'espèce; mais cette répartition est loin d'être constante.

Hôtes. — Le *Cœnurus serialis* est parasite des genres *Lepus* et *Sciurus*. Voici la liste de ces animaux, chez lesquels il a été sûrement trouvé : *Lepus cuniculus ferus*; *L. cuniculus domesticus*; *L. timidus*; *L. variabilis*; *L. californicus*; *L. texensis*; *L. callotis*; *Sciurus vulgaris*; *Sc. vulpinus* (1).

(1) A cette liste, suivant les observations du Gaiger et de Dey dans l'Inde, il faudrait ajouter la Chèvre.

En France, ce sont les deux premiers de ces Rongeurs qui représentent les hôtes habituels.

Répartition géographique. — Le parasite est seulement connu dans les pays suivants : Europe (France, Angleterre, Écosse, Suisse, Italie, Russie) ; Asie (Sibérie, Japon, Inde) ; Afrique (Tunisie) ; Amérique (États-Unis) ; Océanie (Australie, Nouvelle-Zélande).

Habitat. — Le Cénure sérial est surtout un parasite du tissu conjonctif intermusculaire ; exceptionnellement il peut se développer dans les grandes séreuses ou dans le canal rachidien. Les régions musculaires les plus diverses peuvent lui donner asile ; mais celles qui nous ont paru les plus fréquemment atteintes sont : les masséters externes, les cuisses, les épaules, le cou, le dos, etc.

Ordinairement, le parasite est décelable à l'extérieur soit à simple vue, soit à la palpation. La saillie qui résulte de sa présence, et qui est plus ou moins volumineuse suivant le développement du parasite et suivant la région ou il est fixé, donne à la palpation l'impression d'une tumeur indolore, ferme, élastique, à la surface de laquelle la peau reste mobile.

Il n'y a donc aucune difficulté à distinguer les Cénures des abcès.

Notons, en passant, que ce relief du parasite à l'extérieur facilite beaucoup sa ponction ou son extirpation.

Nombre. — Le plus souvent, dans les cas de cénurose naturelle, il n'existe qu'un seul parasite ; mais sa multiplicité n'est pas non plus très rare ; on constate alors deux, trois ou quatre kystes groupés dans la même région ou disséminés dans des régions diverses ; il est tout à fait exceptionnel d'en rencontrer un très grand nombre, comme dans l'observation relatée par Morot, où il a pu en être compté jusqu'à 70.

Volume. — Voici, d'après les expériences de Baillet et nos propres observations, le volume approximatif du Cénure sérial à différentes époques de son développement.

18-19e jours. Vésicule homogène ovoïde ou sphéroïde de 0 mill. 750 à 3 mill. de diamètre ;

22-25e jours. Vésicule homogène de 2 millimètres à 4 mill. de diamètre ;

46e jour. Vésicule du volume d'une cerise ; scolex en forma-

tion, quelques-uns déjà aptes à donner des Ténias chez le Chien (Baillet);

3e mois. Vésicule du volume d'une noix; scolex bien constitués, mûrs;

4e mois. A partir de ce moment, le parasite, à peu près parvenu à son complet développement, atteint, nous l'avons dit, un volume qui varie entre celui d'une noix et celui d'une petite pomme. Pour les kystes en relief dans la cavité abdominale, il n'est pas très rare de constater un volume de 200 à 250 cent. cubes; l'un de nous, dans ces conditions, a même relevé le volume énorme de 800 cent. cubes.

Longévité. — Lorsque les kystes sont peu nombreux et qu'ils ne gênent aucun organe essentiel, le Lapin ne paraît pas se ressentir de ses parasites; on peut garder assez longtemps les animaux avec leurs kystes. Ainsi le professeur Railliet a pu conserver vivant, pendant plus de deux années, un Lapin porteur d'un Cénure.

Tantôt par un processus de régression ou de suppuration, tantôt par simple rupture, les kystes finissent à la longue par disparaître. Par contre, il n'est pas exceptionnel de constater leur multiplication.

Vésicules filles. — Le Cénure sérial possède, en effet, comme l'Échinocoque, la propriété de donner naissance à des vésicules filles, c'est-à-dire à des Cénures secondaires.

Quand la multiplication doit se produire, elle débute vers l'âge de six à huit mois. Nous avons constaté qu'elle s'effectue aux dépens des scolex. Un certain nombre de ceux-ci deviennent légèrement hydropiques; peu à peu leur volume augmente, tandis que le pédicule qui les unit à la membrane s'étrangle, pour arriver finalement à se détruire. Chacun de ces corps, désormais libres, présente l'aspect d'un petit Cysticerque, formé d'une vésicule, souvent de teinte rosée ou rouge-brunâtre, portant en un point de sa surface le scolex primitif, encore intact.

A une phase plus avancée, cette vésicule a pris les dimensions d'une noisette; le scolex a disparu, mais il est remplacé par de nombreux petits points blancs, souvent groupés en cercle, ébauches de scolex nouveaux. Le développement se poursuit, et bientôt se trouve constitué un nouveau Cénure.

Comme une telle transformation porte en général sur plusieurs scolex à la fois, le Cénure primitif se trouve représenté au bout d'un certain temps par une masse de Cénures secondaires. C'est ce qui explique le cloisonnement si complexe réalisé chez certains vieux parasites, cloisonnement qui rend très difficile le prélèvement de l'antigène. Pour éviter cette difficulté, il est à recommander de ne pas laisser vieillir les Cénures au delà de six mois environ.

Développement expérimental

C'est Baillet qui, le premier, a obtenu le développement expérimental du Cénure chez le Lapin en lui faisant ingérer des œufs provenant du *T. serialis*.

L'expérience n'est pas toujours aussi simple qu'elle paraît l'être *a priori*, et donne lieu assez souvent à des échecs. C'est que peut-être beaucoup d'œufs ne contiennent pas d'embryon bien constitué, ou parcourent le tube digestif sans éclore, ou encore que les hexacanthes transportés dans les muscles s'arrêtent dans leur développement. De telle façon qu'il faut faire ingérer au Lapin un nombre assez considérable d'œufs pour avoir des chances de succès. Par contre, en exagérant ce nombre outre mesure, on s'expose à voir succomber les Lapins dans l'espace de huit à vingt jours, avant que les parasites aient eu le temps de se développer. Il y a donc deux écueils à éviter, l'un par défaut, l'autre par excès. On comprendra qu'il est impossible de fixer un chiffre moyen, même approximatif, du nombre d'œufs à administrer. Le procédé qui paraît nous avoir donné les meilleurs résultats, et auquel nous nous sommes arrêtés, consiste à choisir trois ou quatre proglottis récemment expulsés et qu'un simple examen par transparence a montrés encore pourvus d'œufs. A l'aide d'une pince anatomique, ces anneaux sont portés au fond de la bouche des Lapins, de façon qu'un mouvement de déglutition les entraîne dans l'estomac. L'opération, fort simple, offre plus de garantie que le mélange avec les aliments.

En opérant sur des animaux de six mois environ, on peut escompter un résultat positif chez 40 à 50 p. 100.

Greffes. — A plusieurs reprises nous avons tenté de greffer

des lambeaux de membranes, ou des scolex, en les insérant sous la peau ou dans le péritoine de Lapins; aucun de nos essais n'a été couronné de succès. Il ne semble donc pas que ce procédé soit à recommander pour obtenir la multiplication des parasites.

II. — RECHERCHES SÉROLOGIQUES

A. — *Précipitines. Lysines.*

Nous avons recherché si le sérum des porteurs de Cénures renferme des anticorps spécifiques.

Nous avons pu nous procurer 10 Lapins à cénurose spontanée. Le sérum de ces animaux ne renfermait pas du tout de précipitines. Pour la recherche des précipitines et des lysines, nous avons employé la technique indiquée par Weinberg pour l'étude des sérums hydatiques.

Comme antigène, nous avons cherché à utiliser soit le liquide du kyste pur, soit l'extrait aqueux de membranes et de scolex, soit encore l'extrait aqueux de *Tænia serialis*; mais nous avons été obligés de renoncer à ces deux derniers, parce qu'ils donnent, parfois aussi, une fixation avec le sérum de Lapins normaux. Quelques échantillons de liquide échinococcique peuvent amener aussi une fixation non spécifique mais légère, et seulement lorsqu'on dépasse la dose de 0,6 à 1 cent. cube. Nous avons donc employé dans nos expériences des doses inférieures (0,1, 0,2 et 0,4 cent. cube).

Dans ces conditions, nous avons obtenu la réaction de fixation très nette 2 fois sur 10 sérums étudiés.

L'examen du sérum, dans 4 cas de cénurose expérimentale, a donné des résultats meilleurs; la réaction des précipitines a été nettement positive dans 2 cas; dans le troisième, le mélange sérum-antigène a montré un précipité à peine marqué; enfin, le sérum du quatrième Lapin s'est montré nettement négatif.

La réaction de fixation a été positive pour ces 4 sérums.

Le faible pourcentage trouvé pour les Lapins à cénurose spontanée nous a fait penser qu'il pourrait se passer, dans cette affection parasitaire, le même phénomène que celui décrit par Weinberg pour les porteurs de kystes hydatiques : à l'état

normal, le liquide parasitaire ne traverse pas, ou traverse très difficilement, la paroi du kyste ; l'absence d'anticorps est donc naturellement attribuable à la non-résorption de l'antigène par l'organisme. Les anticorps apparaissent, au contraire, aussitôt qu'un traumatisme ou une altération quelconque de la membrane du parasite a permis le passage du liquide dans les tissus voisins.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons injecté à des Lapins, dont le sérum avait donné une réaction négative, de 10 à 15 cent. cubes de liquide prélevé par ponction de leur propre kyste.

Dans ces conditions, 5 Lapins ont reçu chacun une seule injection sous-cutanée ou intra-péritonéale. Les animaux ont été examinés au bout de vingt à soixante-cinq jours. Le sérum de quatre d'entre eux a donné une réaction positive nette ; celui du cinquième, une réaction très légère. Chez ce dernier, on a obtenu une réation fortement positive, dix-huit jours après une deuxième injection de liquide parasitaire. Un sixième et un septième Lapins ont été injectés avec leur propre liquide parasitaire, mais après extirpation de leurs kystes absolument intacts. Chez un huitième et un neuvième Lapin, nous avons incisé légèrement les kystes *in situ*, de manière à laisser écouler librement du liquide dans le tissu sous-cutané. Enfin, dans le dixième cas, l'extirpation du kyste était difficile et, malgré nous, une très petite quantité d'antigène s'est écoulée dans la plaie.

Le sérum de ces cinq derniers animaux a été examiné à plusieurs reprises. Dès le dixième jour, il commençait à renfermer des anticorps spécifiques; mais la réaction de fixation s'est montrée très forte trois semaines après l'injection d'antigène.

Il reste à expliquer le plus grand pourcentage de réactions de fixation positives chez les animaux infectés expérimentalement par les Cénures. Nous y voyons deux causes : d'abord la multiplicité des kystes ; alors que les Lapins à cénurose spontanée présentaient en général un seul, très rarement deux kystes, nous en avons toujours trouvé plusieurs (jusqu'à 8) chez les animaux infectés expérimentalement.

D'autre part, il est probable que les anticorps se forment surtout pendant les premiers moments de l'infestation durant lesquels les parasites ne sont pas encore entourés d'un kyste

réactionnel. Or, dans l'infestation artificielle, il y a transport dans l'organisme d'un grand nombre d'hexacanthes, et quoique ceux-ci ne poursuivent pas tous leur évolution cystique, il n'en résulte pas moins des phénomènes intenses de réaction qui aboutissent à la production d'une grande quantité d'anticorps.

Quant à ce fait que nous avons obtenu, dans deux cas sur quatre de cénurose expérimentale, la réaction des précipitines, et 7 fois sur 7 après l'opération ou l'injection de liquide parasitaire dans le péritoine ou sous la peau, alors qu'elle était trouvée négative dans 10 cas de cénurose spontanée, il s'explique, comme dans l'échinococcose, par la richesse très grande en anticorps des sérums des Lapins à cénurose expérimentale, opérés ou injectés. Weinberg, en effet, n'a trouvé des précipitines que dans le sérum des porteurs d'Échinocoques très riche en lysines. Les sérums pauvres en lysines en renferment une quantité juste suffisante pour donner une réaction de fixation positive, mais insuffisante pour donner la réaction des précipitines.

Nous avons constaté les mêmes faits, en étudiant le sérum de porteurs de Cénures. Les sérums précipitants donnaient une réaction de fixation positive, même dilués 15 et 20 fois.

Le sérum des Lapins porteurs de *Cœnurus serialis* ou de ceux injectés avec du liquide de ce parasite ne donne pas, en général, la réaction de fixation avec le liquide échinococcique.

Il n'en est pas de même pour les cas de cénurose expérimentale ; ici, le sérum donne quelquefois une réaction de fixation avec le liquide d'Échinocoque. Cette réaction de groupe est cependant légère; les sérums dilués, qui donnent encore une réaction de fixation très nette avec l'antigène cénurien, ne sont plus positifs avec le liquide échinococcique.

Les recherches faites avec d'autres antigènes, comme le liquide de *Cysticercus pisiformis* ou celui de *Cysticercus tenuicollis*, ont donné des résultats négatifs ou très faiblement positifs.

Notons, en passant, que nous avons également examiné le sérum de deux Chiens qui hébergeaient de nombreux *Tænia serialis*, ainsi que le sérum recueilli chez deux autres Chiens quatre semaines après l'ingestion de membranes de *Cœnurus serialis*. Nos essais ne nous ont donné que des résultats négatifs.

aussi bien avec le liquide du kyste qu'avec l'extrait aqueux de *Tænia serialis*.

B. — *Anaphylaxie passive*; *anaphylaxie active*.

Nous avons recherché si le sérum des Lapins porteurs de Cénures renferme des anticorps anaphylactiques, c'est-à-dire s'il est capable de conférer un état d'anaphylaxie passive au Cobaye. Nous avons étudié à ce point de vue 5 sérums provenant des cas de cénurose spontanée et 4 sérums de cénurose expérimentale.

Nos observations sont résumées dans le tableau I.

Comme on le voit, tous les sérums ont conféré l'anaphylaxie passive au Cobaye. Les phénomènes anaphylactiques observés étaient toujours assez graves, quelquefois même mortels. Deux fois, nous avons observé le fait constaté par Weinberg et A. Ciuca au cours de leurs recherches sur l'anaphylaxie hydatique : le sérum cénurien, ne donnant pas de réaction de fixation, peut renfermer des anticorps anaphylactiques.

Nous avons également examiné le sérum recueilli chez 5 Lapins quinze jours après l'injection de liquide cénurien ou après l'opération ; cette fois, les Cobayes préparés ont montré, après l'injection déchaînante de liquide cénurien, des phénomènes anaphylactiques beaucoup moins marqués. Par contre, le sérum de ces Lapins était parfois toxique pour le Cobaye, entraînant la mort de 24 à 36 heures après son injection.

Les résultats que nous venons d'exposer ne laissent aucun doute sur les propriétés anaphylactiques du sérum de porteurs de Cénures. Cette interprétation des faits observés est encore confirmée par la facilité avec laquelle on arrive à anaphylactiser activement le Cobaye avec le liquide de Cénures.

Après avoir montré dans nos premières recherches qu'il est possible d'anaphylactiser les animaux avec le liquide cénurien, nous avons fait une série d'expériences pour établir : *a*) la dose minima sensibilisante; *b*) la meilleure voie d'injection de la dose préparante; *c*) l'époque de la sensibilisation maxima, ainsi que la durée de la sensibilisation; et enfin *d*) la dose déchaînante minima.

TABLEAU I. — Anaphylaxie passive.

NUMÉROS des lapins.	NUMÉROS des cobayes.	POIDS	DOSE préparante.	VOIE d'injection.	INTERVALLE entre les 2 injections.	DOSE déchaînante.	RÉSULTATS
		gr.	c.c.			c.c.	
2	10	200	3	Péritonéale.	48 h.	1	Très gravement malade, 1 h. 1/2. Rétabli après 2 h. 1/2.
	11	400	*Id.*	*Id.*	*Id.*	2	Très gravement malade, 1 heure. Rétabli après 2 heures.
4	38	260	4	*Id.*	41 h.	1 1/2	Très gravement malade, 2 heures. Rétabli après 4 heures.
	39	280	*Id.*	*Id*	*Id.*	2	Très gravement malade, 3 heures. Rétabli après 5 heures.
3	37	280	5	*Id.*	48 h.	2	Très gravement malade, 2 heures. Le lendemain, rétabli.
5	40	290	*Id.*	*Id.*	*Id.*	2	Très gravement malade, 1 h. 1/2. Rétabli après 3 h. 1/2.
12	2 F	350	4	*Id.*	*Id.*	2	Très gravement malade. 25 min. Rétabli après 2 heures.
	4 F	300	*Id.*	*Id.*	*Id.*	2	Très gravement malade. Mort après 6 minutes.
	5 F	350	2 1/2	*Id.*	*Id.*	2	Très gravement malade. Mort après 5 minutes.
13	11 F	290	4	*Id.*	*Id.*	2	Très gravement malade. Mort après 4 minutes.
	12 F	380	2 1/2	*Id.*	*Id.*	2	Très gravement malade, 35 min. Rétabli après 3 heures.
	13 F	350	*Id.*	*Id.*	*Id.*	2	Très gravement malade, 30 min. Rétabli après 2 heures.
11	18 F	270	4	*Id.*	*Id.*	1 1/2	Très malade, 45 minutes. Rétabli après 3 heures.
	19 F	280	2 1/2	*Id.*	*Id.*	2	Très malade, 30 minutes. Rétabli après 1 heure.
11	20 F	380	4	*Id.*	*Id.*	2	Très gravement malade, 50 min. Rétabli après 3 heures.
10	36 I	360	5	*Id.*	*Id.*	2	Très malade. 1 heure. Rétabli après 3 heures.
	37 I	320	*Id.*	*Id.*	*Id.*	2	Très gravement malade, 30 min. Rétabli après 2 heures.
12	38 I	370	5	*Id.*	*Id.*	2	Assez gravement malade, 6 min. Rétabli après 1 heure.
	39 I	320	*Id.*	*Id.*	*Id.*	2	Mort 38 h. après l'inj. de sérum.
13	40 I	400	5	*Id.*	*Id.*	2	Peu malade. Rétabli après 1 heure.
	41 I	370	*Id.*	*Id.*	*Id.*	2	Mort 38 h. après l'inj. de sérum.
11	42 I	290	5	*Id.*	*Id.*	2	Peu malade, 1/2 heure. Rétabli après 45 min.
	43 I	310	*Id.*	*Id.*	*Id.*	2	Mort 24 h. après l'inj. de sérum.
14	34 I	260	5	*Id.*	*Id.*	2	Mort 24 h. après l'inj. de sérum.
	35 I	280	*Id.*	*Id.*	*Id.*	2	Peu malade. Rétabli après 1/2 heure.

Quelques-uns de ces résultats sont consignés dans le tableau II.

TABLEAU II. — Anaphylaxie active.

NUMÉROS des cobayes.	POIDS	DOSE préparante.	VOIE d'injection.	DURÉE de la sensibilisation.	DOSE déchaînante.	RÉSULTATS
	gr.	c.c.		jours.	c.c.	
1	315	0,5	Sous-cutanée.	14	1,5	Malade pendant 2 heures; rétabli.
2	295	0,5	*Id.*	22	1,5	Malade pendant 3 heures; mort.
3	325	0,5	*Id.*	22	1,5	Malade pendant 1 heure; mort.
4	340	0,5	*Id.*	62	1,5	Très malade pendant 20 m.; rétabli.
5	270	1	*Id.*	72	1,5	Mort en 6 minutes.
6	310	1,5	*Id.*	100	1	Très malade pendant 7 h.; rétabli.
7	490	2	*Id.*	46	1	Malade pendant 3 heures.
8	300	2	*Id.*	72	1,5	Mort en 5 minutes.
9	360	3	*Id.*	46	1	Mort en 6 minutes.
10	300	3	*Id.*	105	1	Mort en 8 minutes.
11	370	4	*Id.*	17	1	Mort en 4 minutes.
12	620	4	*Id.*	26	2	Très malade pendant 2 h.; rétabli.
13	350	4	*Id.*	46	1	Mort en 3 minutes.
14	320	4	*Id.*	62	1	Mort en 35 minutes.
15	340	0,5	Intrapéritonéale.	18	1	Très malade pendant 3 h.; rétabli.
16	300	1	*Id.*	62	1	Mort en 8 minutes.
17	300	1,5	*Id.*	105	1	Mort en 16 minutes.
18	340	2	*Id.*	17	1	Mort en 6 minutes.
19	350	3	*Id.*	17	1	Mort en 4 minutes.
20	280	3	*Id.*	26	1	Très malade pendant 3 h.; rétabli.
21	245	3	*Id.*	26	1,5	Mort en 3 min. et demie.
22	310	3	*Id.*	26	1,5	Mort en 1 min. et demie.
23	300	3	*Id.*	26	1	Mort en 2 min. et demie.
24	365	3	*Id.*	72	1	Mort en 5 minutes.
25	620	4	*Id.*	51	1	Mort en 4 minutes.
26	350	4	Intraveineuse.	18	1	Mort en 4 minutes.
27	210	5	*Id.*	20	1	Mort en 6 heures.
28	350	»	*Id.*	Témoin.	5	Pas de phénomènes anaphylact.
29	210	»	*Id.*	*Id.*	4,5	Pas de phénomènes anaphylact.
30	320	»	*Id.*	*Id.*	6	Pas de phénomènes anaphylact.
31	245	»	*Id.*	*Id.*	4	Pas de phénomènes anaphylact.
32	300	»	*Id.*	*Id.*	6	Pas de phénomènes anaphylact.
33	330	»	*Id.*	*Id.*	8	Un peu triste. Rétabli après 15 m. Trouvé mort le lendemain.

a) *Dose préparante minima.* — La première série de Cobayes comprend plusieurs lots : les animaux de chaque lot reçoivent en injection sous-cutanée de 0,5 à 4 cent. cubes (0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 3 ; 4 cent. cubes) de liquide parasitaire ; une autre expérience porte sur une deuxième série préparée avec les mêmes doses, mais avec la seule différence que l'antigène est injecté dans le péritoine. Ces expériences ont montré que tous les animaux, même ceux préparés avec 0,5 cent. cube, montrent des phénomènes certains d'anaphylaxie ; le choc anaphylactique mortel n'est observé d'une façon presque constante que chez les Cobayes

sensibilisés avec 3 ou 4 cent. cubes, que l'injection préparante ait été faite sous la peau ou dans la cavité péritonéale.

b) *Voie d'injection.* — Bien qu'on obtienne sensiblement les mêmes résultats en sensibilisant les animaux par la voie sous-cutanée, ou par la voie péritonéale, cette dernière paraît cependant préférable. Par la voie intra-veineuse, nous n'avons pu injecter que peu d'animaux; deux Cobayes ainsi préparés par l'injection de 4 et 5 cent. cubes sont morts de choc anaphylactique à la suite d'une injection d'épreuve de 1,5 cent. cube.

c) *Époque de la sensibilisation maxima et durée de la sensibilisation.* — On peut observer déjà des phénomènes d'anaphylaxie 14 jours après la première injection; mais le choc anaphylactique mortel n'est obtenu qu'après le 18e jour. A ce moment, les Cobayes présentent, à la suite de l'injection d'épreuve, des phénomènes absolument semblables à ceux décrits pour l'anaphylaxie active sérique; les animaux meurent en une à quatre minutes. La mort survient entre quatre et six minutes lorsque l'épreuve est faite 50 à 75 jours après l'injection préparante. Plus tard, du 75e au 105e jour, l'injection déchaînante ne provoque pas la mort immédiate; après les premiers phénomènes violents, certains Cobayes tombent sur le dos et restent ainsi paralysés huit à quinze minutes, avec une respiration difficile très ralentie; d'autres, après avoir subi une crise de convulsions, restent tristes et présentent une respiration accélérée. Tous ces animaux meurent au bout de trente minutes à six heures.

Nos expériences n'ont pu être prolongées au delà de cent cinq jours, faute d'antigène.

d) *Dose déchaînante.* — La dose déchaînante optima est de 1,5 cent. cube, en injection intra-veineuse. On peut cependant obtenir le choc anaphylactique, même avec 0,5 cent. cube.

Nos observations sont résumées dans le tableau II.

Ajoutons que la sensibilisation des Cobayes, dans nos expériences, n'est nullement attribuable à une trace de sérum de Lapin qui aurait pu être injectée avec le liquide parasitaire: les animaux préparés sont restés insensibles à l'injection intra-veineuse de fortes doses de sérum de Lapin neuf.

Nous avons fait également quelques expériences pour voir si l'anaphylaxie cénurienne active est spécifique.

Les Cobayes sensibilisés avec le liquide cénurien n'ont pas présenté de phénomènes anaphylactiques après l'injection de liquide de *C. tenuicollis*, ni après celle de liquide échinococcique.

D'autre part, des Cobayes sensibilisés soit avec le liquide de *Cysticercus tenuicollis*, soit avec le liquide d'*Echinococcus polymorphus*, ont été éprouvés, les uns avec le liquide préparant, les autres avec le liquide de *C. serialis*.

Des deux Cobayes préparés avec le *C. tenuicollis*, l'un, éprouvé avec le liquide de *C. serialis*, a présenté d'abord des symptômes anaphylactiques peu marqués, mais est mort au bout de dix-huit heures ; l'autre, éprouvé avec le liquide de *C. tenuicollis*, a manifesté des phénomènes très violents, mais s'est rétabli en une heure et demie.

Des quatre Cobayes préparés avec le liquide d'Echinocoque, deux n'ont montré aucun phénomène morbide après l'injection de liquide de *C. serialis* ; les deux autres, éprouvés avec le liquide d'Echinocoque, ont été très malades pendant une ou deux heures, mais se sont rétablis au bout de deux à cinq heures.

C. — *Toxicité du liquide de* Cœnurus serialis.

Dans le but de rechercher la toxicité du liquide de *Cœnurus serialis*, nous en avons injecté des doses variant de 5 à 12 cent. cubes dans la veine de 8 Cobayes. Une partie de ces animaux nous ont servi en même temps de témoins pour les phénomènes anaphylactiques.

Le liquide injecté provenait soit de kystes de volume normal, soit d'un kyste de volume exceptionnel de 250 cent. cubes environ. Nous avons constaté que le liquide provenant de ce dernier était manifestement moins toxique à la dose de 12 cent. cubes que les autres utilisés à la dose de 5 à 8 cent. cubes.

Aussitôt après l'injection, les Cobayes présentaient de légers phénomènes d'intoxication se manifestant par des frissons, du tremblement, de la dyspnée, parfois de la parésie du train postérieur, ces phénomènes disparaissant dans le délai de une heure à cinq heures, suivant l'importance de la dose injectée.

Un seul Cobaye, ayant reçu 8 cent. cubes et paraissant rétabli quinze minutes après l'injection, fut trouvé mort le lendemain.

III. — RÉSUMÉ DE NOS EXPÉRIENCES

A. — *Cénurose spontanée.*

Lapin n° 1. — Un kyste dans la région cervicale et un autre dans la région fessière. On recueille, par ponction des deux kystes, environ 60 cent. cubes de liquide. La réaction de fixation, pratiquée le 25 mars avec le sérum de l'animal recueilli peu de temps avant la mort, est négative. Il n'existe pas de précipitines. Mort le 8 mars 1912.

Lapin n° 2. — Kyste de la fesse droite. On recueille, par ponction, 38 cent. cubes de liquide parasitaire. L'animal est saigné à blanc le 8 mars 1912. On rencontre dans le gros intestin un grand nombre d'Oxyures et dans le péritoine 7 *Cysticercus pisiformis.*

25 mars. La réaction de fixation est négative. Pas de précipitines.

Lapin n° 3. — Kyste de la région oculaire gauche. On recueille 50 cent. cubes de liquide par ponction du kyste. L'animal est saigné à blanc le 8 mars 1912; on rencontre des *Cysticercus pisiformis* dans le péritoine.

25 mars 1912. La réaction de fixation est négative. Pas de précipitines.

Lapin n° 4. — Kyste de l'épaule droite. Le 18 mars 1912, on prélève 60 cent. cubes de sang. Le kyste est opéré; on recueille 25 cent. cubes de liquide parasitaire.

25 mars 1912. La réaction de fixation est négative. Pas de précipitines.

14 avril 1912. L'animal est saigné à blanc.

16 avril. La réaction de fixation pratiquée avec le sérum recueilli deux jours auparavant est, cette fois, nettement positive dans tous les tubes où l'on a employé comme antigène le liquide de *Cœnurus serialis*, et négative avec le liquide échinococcique. Il existait aussi un précipité dans les deux tubes.

Lapin n° 5. — Kyste de la fesse gauche. Le 18 mars 1912, on prélève 50 cent. cubes de sang. On extirpe le kyste; on recueille 50 cent. cubes de liquide parasitaire.

25 mars. La réaction de fixation est négative. Pas de précipitines. La réaction de fixation, recommencée le lendemain, est encore négative.

14 avril. L'animal est saigné à blanc.

16 avril. Le sérum, recueilli deux jours auparavant, donne une réaction de fixation nettement positive dans tous les tubes et négative avec le liquide échinococcique.

Lapin n° 6. — Petit kyste sous la peau de l'abdomen. L'animal est injecté dans le péritoine avec le liquide parasitaire recueilli en ponctionnant le kyste. Ce dernier est rompu sous la peau.

1er octobre 1912. L'animal est saigné 65 jours après l'injection.

3 octobre. La réaction de fixation est positive, mais faible.

6 octobre. La réaction de fixation est cette fois très nettement positive avec le liquide *C. serialis*, négative avec le liquide échinococcique. Pas de précipitines.

7 octobre. On réinjecte sous la peau 10 cent. cubes de liquide de Cénure.

23 octobre. On prélève de nouveau du sang à l'animal.

25 octobre. La réaction de fixation est très nettement positive avec le liquide *C. serialis*, négative avec le liquide échinococcique.

Lapin n° 7. — Kyste de la région oculaire.

17 septembre. On prélève au Lapin 40 cent. cubes de sang. Le kyste est extirpé. On recueille 30 cent. cubes de liquide parasitaire. Une partie du liquide s'écoule dans la plaie.

18 septembre. La réaction de fixation est positive.

2 octobre. On saigne le lapin pour la deuxième fois.

3 octobre. La réaction de fixation est fortement positive avec le liquide cénurien ; négative avec le liquide échinococcique. La réaction des précipitines est aussi positive.

12 octobre. On saigne le Lapin pour la troisième fois.

16 octobre. La réaction est fortement positive avec le liquide de *C. serialis*.

Lapin n° 8. — Un kyste. 25 septembre, l'animal est saigné à blanc. On recueille 15 cent. cubes de liquide parasitaire.

3 octobre. La réaction de fixation est nettement positive avec le liquide de *C. serialis*, négative avec le liquide échinococcique.

10 octobre. Même résultat.

Lapin n° 9. — Trois petits kystes : un premier en avant de l'épaule droite, un second sous la peau de l'abdomen, et le troisième, plus volumineux, sur la face postérieure de la jambe gauche.

29 septembre. On prélève du sang à l'animal.

30 septembre. On extirpe deux kystes et on ponctionne le troisième. On recueille ainsi 40 cent. cubes de liquide.

3 octobre. La réaction de fixation et celle des précipitines sont négatives.

10 octobre. On prélève du sang de nouveau.

11 octobre. La réaction de fixation est négative dans les tubes 1 et 2, et nettement positive dans le tube 3.

17 octobre. L'animal est saigné pour la troisième fois. Il meurt deux jours après.

20 octobre. La réaction de fixation est très fortement positive avec le liquide de *C. serialis*. La réaction des précipitines est également positive.

Lapin n° 10. — 20 décembre 1913. L'animal, spontanément infesté, était porteur d'un kyste du masséter gauche, du volume d'une noix.

Nous avons prélevé au Lapin 35 cent. cubes de sang. Après la saignée, le kyste a été extirpé, et, au cours de l'opération, un peu de liquide s'est écoulé dans la plaie.

22 décembre. Nous avons préparé les deux cobayes 36 I et 37 I en leur injectant dans le péritoine 4 cent. cubes du sérum.

24 décembre. Les deux cobayes, injectés dans la veine avec 2 cent. cubes de liquide de *C. serialis*, ont présenté des symptômes graves d'anaphylaxie passive.

22 décembre. La réaction des précipitines est négative.

23 décembre. La réaction de fixation est négative avec le liquide de *C. serialis*, l'extrait de membranes et le liquide échinococcique.

10 janvier 1914. L'animal est saigné à blanc.

12 janvier 1914. La réaction des précipitines est nettement positive ; la réaction de fixation est positive avec le liquide de *C. serialis*, faiblement positive avec le liquide échinococcique et le liquide de *Cysticercus tenuicollis*.

B. — *Cénurose expérimentale.*

Le 10 mars 1913, nous mettons en expérience 8 jeunes lapins (4 d'une nichée de 6 mois; 4 autres d'une nichée de 22 semaines) en faisant ingérer à chacun trois anneaux de *Tænia serialis* expulsés par un chien infesté par nous les 25 novembre 1911 et 2 février 1913; nous nous assurons préalablement que ces proglottis contiennent des œufs en abondance.

Deux lapins meurent les 17e et 19e jours sans qu'il soit possible d'en faire l'autopsie.

Quatre lapins ont présenté de 1 à 10 kystes bien développés au bout de 4 à 7 mois.

Deux lapins n'ont jamais montré de cénures.

Lapin n° 11. — L'animal a été infesté très jeune, le 10 mars 1913, avec des proglottis de *Tænia serialis.*

Le 1er décembre 1913, il était porteur de six kystes : deux du cou, trois du masséter gauche; le sixième du masséter droit. Nous lui avons prélevé 30 cent. cubes de sang, et l'avons ensuite opéré de la façon suivante : un petit kyste du cou est extirpé complètement; ponctionné après l'opération, il renfermait un liquide très clair. En extirpant les deux premiers kystes du masséter gauche, nous avons laissé écouler du liquide parasitaire dans la plaie opératoire. Le troisième kyste du masséter gauche fut seulement ponctionné, la membrane du kyste étant laissée en place. En enlevant le kyste du masséter droit, nous avons rompu la membrane, et le liquide s'est écoulé dans la plaie opératoire. Nous avons recueilli en tout 35 cent. cubes de liquide de *C. serialis.*

2 décembre. Nous avons préparé deux Cobayes, n° 18 F et 19 F, en leur injectant dans le péritoine 2 c. c. 1/2 et 4 cent. cubes de sérum.

4 décembre. Ces Cobayes, éprouvés dans la veine avec du liquide de *C. serialis*, ont présenté des symptômes graves d'anaphylaxie passive.

3 décembre. La réaction de fixation est nettement positive avec le liquide de *C. serialis* et le liquide échinococcique; négative avec l'extrait aqueux de membranes de *C. serialis.* Le sérum dilué au 1/5 donne encore une réaction positive avec le liquide de *C. serialis.*

20 décembre. 20 jours après l'opération, l'animal est saigné à blanc. A l'autopsie, on trouve encore un nouveau kyste situé à la face interne de l'épaule, ayant les dimensions d'une grosse noix; il contenait 10 cent. cubes de liquide.

22 décembre. Avec le sérum recueilli deux jours avant, nous avons préparé les Cobayes n° 42 I et 43 I, par injection à chacun, dans le péritoine, de 5 cent. cubes. Le 43 est mort le lendemain.

24 décembre. Le Cobaye 42, éprouvé par injection intraveineuse de 2 cent. cubes de liquide de *C. serialis*, a été très malade une demi-heure après l'injection.

22 décembre. La réaction des précipitines est très fortement positive, plus intense que lors de l'expérience du 3 décembre.

23 décembre. La réaction de fixation est positive avec le liquide de *C. serialis* et avec le liquide échinococcique; négative avec l'extrait de membranes de *C. serialis* et de *Cysticercus tenuicollis.*

Lapin n° 12. — Infesté le 10 mars 1913 avec des proglottis de *Tænia serialis.* Le 1er décembre 1913, l'animal était porteur de deux kystes : l'un du cou, l'autre du jarret droit. En ponctionnant le kyste du cou, on a prélevé 30 cent.

cubes de liquide parasitaire, clair. Nous avons retiré du kyste du jarret 12 cent. cubes d'un liquide jaunâtre, filant, muqueux, presque consistant. Le kyste était en état de dégénérescence ; il renfermait quelques vésicules filles à liquide encore transparent. Nous avons prélevé au Lapin 45 cent. cubes de sang, puis nous avons extirpé les deux kystes. Pendant l'opération, une certaine quantité de liquide parasitaire s'est écoulée dans la plaie opératoire.

2 décembre. Nous avons injecté trois Cobayes (nos 2 F, 4 F et 5 F) dans le péritoine avec du sérum (2 1/2 à 4 cent. cubes) de Lapin.

4 décembre. Les Cobayes nos 4 et 5 sont morts avec des symptômes d'anaphylaxie passive ; le Cobaye no 2 a été très malade pendant vingt-cinq minutes.

5 décembre. Le sérum du Lapin a donné une réaction de fixation nettement positive avec le liquide de *C. serialis* et nettement positive également avec le liquide échinococcique. La fixation pratiquée avec le liquide de *C. serialis* était encore positive, même lorsqu'on employait le sérum dilué au 1/20. La dilution au 1/25 ne donnait plus qu'une légère fixation. Nous avons également pratiqué la réaction de fixation en employant comme antigène l'extrait aqueux de membrane parasitaire dilué au 1/320. La fixation était très faible avec 0,1 de cette dilution, nettement positive avec 0,2 et 0,3 et faiblement positive avec 0,2 et 0,3 de *C. tenuicollis*.

La réaction des précipitines était nettement positive après une demi-heure d'étuve ; le dépôt était considérable, floconneux. Au bout de deux heures, il y avait un dépôt abondant dans le fond du tube.

20 décembre. 20 jours après l'opération, nous avons de nouveau prélevé au Lapin 35 cent. cubes de sang.

22 décembre. Nous avons préparé les Cobayes nos 38 I et 39 I, en leur injectant 5 cent. cubes de sérum dans le péritoine. Le lendemain, le Cobaye no 39 est mort. 24 décembre, le no 38 repris, dans la veine avec 2 cent. cubes de liquide parasitaire, présente des symptômes d'anaphylaxie passive.

22 décembre. La réaction de précipitines pratiquée avec le sérum recueilli deux jours auparavant est encore positive, mais beaucoup plus faible que lors de la première réaction.

23 décembre. La réaction de fixation est nettement positive avec le liquide de *C. s rialis* et le liquide hydatique. Elle est négative avec l'extrait aqueux de membranes de *C. serialis* (dilué au 1/320). Le sérum dilué au 1/20 a donné aussi la réaction positive, comme dans l'expérience du 5 décembre.

10 janvier 1914. Le Lapin est saigné à blanc. A l'autopsie, on ne trouve pas de nouveaux kystes.

12 janvier. La réaction des précipitines est absolument négative.

15 janvier. La réaction de fixation est positive avec le liquide de *C. serialis*, faiblement positive avec le liquide échinococcique et négative avec le liquide de *C. tenuicollis*.

Lapin no 13. — Cet animal a été infecté le 10 mars 1913 avec des proglottis de *Tænia serialis*.

Le 1er décembre 1913, il présentait quatre kystes : trois du masséter et un du membre antérieur. Ces kystes avaient la dimension d'une grosse noix. Nous avons prélevé au Lapin 40 cent. cubes de sang, puis nous l'avons opéré. Le kyste du bras a été ponctionné, puis extirpé. Il contenait 30 cent. cubes de liquide. Nous avons ponctionné et extirpé les kystes du masséter, qui étaient plus petits et qui ne contenaient en tout que 15 cent. cubes de liquide. Après l'opération, nous avons injecté dans le péritoine du Lapin 10 cent. cubes de liquide parasitaire.

2 décembre 1913. Nous avons injecté 2 1/2 et 4 cent. cubes de sérum dans le péritoine des Cobayes nos 11 F, 12 F et 13 F.

4 décembre 1913. Les Cobayes ont été éprouvés par l'injection intraveineuse de 2 cent. cubes de liquide de *C. serialis*. Le no 11 est mort en quatre minutes en présentant des symptômes d'anaphylaxie suraiguë; le no 12 a été très gravement malade pendant 35 minutes; le no 13, pendant 30 minutes.

3 décembre. La réaction des précipitines a été légèrement positive.

5 décembre. La réaction de fixation a été nettement positive avec le liquide de *C. serialis*. Avec l'extrait aqueux de membranes, elle était faiblement positive en employant 0,2 d'antigène et nettement positive avec 0,3 et 0,4. Le liquide échinococcique donnait une réaction tout à fait négative.

20 décembre. Nous avons injecté dans le péritoine des Cobayes nos 40 I et 41 I 4 cent. cubes du sérum recueilli l'avant-veille. Le Cobaye 41 est mort le lendemain de l'injection.

24 décembre. Le Cobaye no 40 a reçu dans la veine 2 cent. cubes de liquide de *C. serialis*; il a été à peine malade.

22 décembre. La réaction des précipitines a été très fortement positive.

23 décembre. La réaction de fixation est nettement positive avec le liquide de *C. serialis* et le liquide échinococcique. Elle est négative avec l'extrait de membranes de *C. serialis* (dilué au 1/320).

10 janvier. Un nouveau kyste étant apparu dans la région sous-scapulaire gauche, nous avons prélevé du sang de la veine.

16 février. Le Lapin est saigné à blanc. L'autopsie donne la surprise de cinq nouveaux kystes : un dans la région sous-scapulaire droite; un, région dorsale; un, cuisse gauche, un, région cervicale et enfin un dernier, énorme, du volume de 250 cent. cubes environ, logé dans l'abdomen et greffé aux muscles psoas. L'animal a donc présenté au total 10 Cénures.

19 février. La réaction des précipitines, avec 1/4, 1/2 et 1 cent. cube, a été nettement positive après une demi-heure à 37 degrés; après une heure et demie, il y avait au fond du tube un très abondant dépôt floconneux. La même réaction avec le liquide de *C. tenuicollis* n'a montré que des traces de précipité après deux heures d'étuve; après seize heures, à la température du laboratoire, il y avait un dépôt assez abondant.

La réaction de fixation est positive avec le liquide de *C. serialis* et le liquide de *C. tenuicollis*.

Lapin no 14. — Cet animal a été infecté le 10 mars 1913 avec des proglottis de *Tænia serialis*.

Le 1er décembre 1913, il présentait un kyste de l'aine droite, du volume d'une petite noix. Nous lui avons prélevé 35 cent. cubes de sang. Le kyste a été ponctionné, puis extirpé; il contenait 10 cent. cubes de liquide. Une heure après l'opération, nous avons injecté dans le péritoine du Lapin 10 cent. cubes de liquide de *C. serialis*.

2 décembre. Nous avons injecté 4 cent. cubes de sérum dans le péritoine du Cobaye no 20 F.

4 décembre. Le Cobaye no 20 F, éprouvé dans la veine avec 2 cent. cubes de liquide de *C. serialis*, a présenté pendant cinquante minutes des symptômes anaphylactiques.

3 décembre. La réaction des précipitines a été très légère, à peine visible.

5 décembre. La réaction de fixation a été légèrement positive avec le liquide *C. serialis*, assez fortement positive avec le liquide hydatique et négative avec l'extrait aqueux de membranes.

20 décembre. Nous avons prélevé 35 cent. cubes de sang.

22 décembre. Nous avons injecté 3 cent. cubes de sérum dans le péritoine des Cobayes nos 34 J et 35 J.

24 décembre. Le Cobaye no 34 est trouvé mort; le Cobaye no 35, éprouvé dans la veine avec 2 cent. cubes de liquide de *C. serialis*, a été à peine malade.

23 décembre. La réaction des précipitines est nettement positive. La réaction de fixation est fortement positive (beaucoup plus nette que le 5 décembre). Elle est positive avec le liquide de *C. serialis* et le liquide échinococcique et négative avec l'extrait de membranes.

10 janvier. Le Lapin est saigné à blanc.

12 janvier. La réaction des précipitines est négative. La réaction de fixation est fortement positive avec le liquide de *C. serialis*, positive avec le liquide échinococcique, et faiblement positive avec le liquide de *C. tenuicollis*.

Conclusions.

1° Les échecs qu'on subit souvent dans la reproduction expérimentale de la cénurose chez le Lapin tiennent surtout à deux causes : 1) ingestion de proglottis vides ou renfermant des œufs incomplètement évolués ; 2) ingestion d'une trop grande quantité d'œufs qui amène une infestation trop massive faisant périr les animaux en 8 à 20 jours, c'est-à-dire avant le développement des Cénures.

2° Lorsqu'on veut reproduire la cénurose chez le Lapin, il faut suivre les indications suivantes :

a) Utiliser des Lapins jeunes de six mois environ ;

b) Choisir des proglottis pleins d'œufs, ce dont il est facile de s'assurer en les examinant par transparence ;

c) Faire ingérer au Lapin les proglottis seuls, sans aliments, suivant la technique indiquée plus haut.

3° Les Cénures deviennent apparents vers le 18e jour ; ils mesurent alors 0,7 à 3 millimètres ; ils arrivent à leur complet développement au bout de quatre mois environ et atteignent le volume d'une noix à celui d'une pomme.

4° Les Cénures produisent quelquefois, comme les Echinocoques, des vésicules filles. Les vésicules filles se développent aux dépens des scolex qui se détachent de la paroi de la vésicule mère, deviennent hydropiques et augmentent de volume.

Les vésicules filles peuvent remplir complètement la vésicule mère, qui se montre alors cloisonnée et difficile à ponctionner. Il est bon de ne pas laisser vieillir les Cénures au delà de six à huit mois.

5° L'étude du sérum des Lapins porteurs de Cénures a permis

de mettre en évidence l'identité absolue des réactions humorales de la cénurose avec celles observées par Weinberg et autres auteurs dans l'échinococcose.

6° Nous n'avons pas trouvé de précipitines dans le sérum des Lapins infestés spontanément par les Cénures. Par contre, sur quatre cas de cénurose expérimentale, deux ont donné une réaction des précipitines des plus nettes. Après l'opération ou l'injection d'une certaine quantité de liquide cénurien, le sérum devient riche en précipitine. Cette précipitine disparaît assez rapidement vers le 15e-20e jour.

7° Les lysines ont été mises en évidence 2 fois sur 10 dans la cénurose spontanée, 4 fois sur 4 chez les Lapins infestés expérimentalement.

8° La réaction de fixation négative obtenue avec le sérum de certains porteurs de Cénures tient à l'absence d'anticorps spécifiques. Cette dernière doit être expliquée, comme dans l'échinococcose, par l'intégrité de la paroi des Cénures, qui ne laisse pas filtrer l'antigène. Cette explication repose sur le fait suivant : les anticorps spécifiques apparaissent toujours chez les Lapins ayant donné une réaction négative, lorsqu'on a provoqué chez eux, par un moyen quelconque (ponction, rupture mécanique du kyste, injection de liquide parasitaire retiré du kyste opéré), la résorption d'antigène.

9° Le pourcentage des réactions positives plus élevé dans la cénurose expérimentale que dans la cénurose spontanée tient probablement à la multiplicité des kystes cénuriens, qu'on obtient toujours dans la cénurose expérimentale.

10° Le sérum cénurien donne parfois la réaction positive avec le liquide échinococcique, et très rarement avec le liquide de *C. tenuicollis*, c'est-à-dire une réaction de groupe ; cette réaction est faible : on ne l'obtient pas avec le sérum dilué, qui donne encore une réaction positive avec l'antigène cénurien.

11° Tous les sérums de porteurs de Cénures ont conféré au Cobaye une anaphylaxie passive, parfois mortelle, qu'ils aient donné la réaction de fixation positive ou négative.

12° On arrive sans difficulté à sensibiliser activement le Cobaye avec le liquide de Cénure.

LE COCCOBACILLE DES SAUTERELLES

par F. D'HERELLE

(Suite et fin.)

IV

RÉSULTATS OBTENUS

Dans ce chapitre je résumerai d'abord ce qui a été fait jusqu'à ce jour dans la République Argentine; je passerai ensuite à qui s'est fait dans d'autres pays.

République Argentine. — La grande majorité des infestations ont été faites sous ma direction, les résultats ont fait l'objet de rapports des Inspecteurs de l'Agriculture (1) au directeur de ce département, ce sont ces rapports que je résumerai ici.

Les premières infestations eurent lieu le 16 janvier 1912 près d'Escalada (Santa Fe) (2) sur des criquets prêts à effectuer la dernière mue et sur de jeunes sauterelles ailées qui parcouraient la région avant de gagner l'Ouest. L'épizootie s'étendit rapidement, le 25 janvier on trouve des vols mourants à 15 kilomètres d'Escalada (3).

Le 22 janvier on trouve de jeunes sauterelles mortes près de San Justo; j'isole le coccobacille spécifique des cadavres, distance de Escalada : 32 kilomètres.

(1) Dans la République argentine il existe une division spéciale du ministère de l'Agriculture chargée de la destruction de la sauterelle, c'est la *Défense agricole* qui a compté plus de trois mille employés. Cette administration a à sa tête le directeur de l'Agriculture, elle comprend un inspecteur général, un sous-inspecteur général, trois inspecteurs de zone, des inspecteurs de 1re et de 2e classe, des commissaires et des sous-commissaires. En mai 1913, elle ne comptait pas moins de 200 employés.

(2) Les expériences préliminaires ont été décrites dans une première note, *Comptes rendus Acad. des Sciences*, t. CLIV, p. 623, je ne les rapporterai pas ici, il en a d'ailleurs été parlé au précédent chapitre.

(3) Rapport de l'inspecteur de Elia, 25 janvier 1912.

22 janvier, infestation de sauterelles jeunes à Matilde; le surlendemain très nombreux cadavres, puis elles prennent leur vol vers l'Ouest après avoir parcouru le district pendant une quinzaine de jours, laissant des mortes de place en place. L'épizootie gagne les autres vols du district (1).

29 janvier, on trouve des sauterelles mortes avec diarrhée à Cordoba, elles provenaient d'un vol passant au-dessus de cette ville, j'isole le coccobacille des cadavres. Point infesté le plus proche: Matilde, 300 kilomètres (2).

3 février, l'inspecteur Barrosi et le commissaire Yparraguire infestent, avec du bouillon de quatre jours reçu de Buenos Aires, des taches de criquets dans le département de Nogoya (Entre-Rios), les bandes sont totalement détruites en quelques jours (3).

Du 23 mars au 14 avril, j'infeste le département de Chamical (La Rioja), fortement envahi par les criquets, ainsi du reste que les autres départements de cette province; comme je suis seul, il m'est impossible d'infester tous les endroits envahis, la province ayant près de 100.000 kilomètres carrés de superficie. Région inculte, couverte de forêts, sans voies de communication: je dois me borner à infester les bandes que je rencontre à proximité des pistes, c'est-à-dire l'infime minorité; malgré cela l'épizootie gagne toutes les bandes et pratiquement aucun insecte n'arriva au stade parfait dans le département infesté; malgré des recherches minutieuses opérées par six employés du ministère de l'Agriculture qui parcoururent la contrée pendant huit jours on ne put trouver de sauterelles (4).

Campagne 1913. — L'invasion se réduit à trois régions :

1° *Rafaela*, sur un espace d'environ 80 kilomètres de long par 40 de large, dans la province de Santa Fe;

2° *Rio Quarto* (*Cordoba*), environ 50 kilomètres par 40 ayant pour centre San Pacho;

3° *Reconquista Santa Fe*, une bande le long du Parana de 80 kilomètres sur 50.

(1) Rapport du sous-commissaire Marchesino, 2 février 1912.
(2) Rapport du sous-inspecteur général, 31 janvier 1912.
(3) Rapports des 7 et 9 février 1912.
(4) Rapport F. d'Herelle, 1er mai 1912.

1° *Rafaela.* — L'inspecteur de zone Tribodi commença les travaux en septembre sur les bandes de vieilles sauterelles arrivant du Nord, malheureusement, par suite du manque de bouillon de culture, il ne put qu'infester peu de vols : il remarqua

à plusieurs reprises que les vols infestés n'effectuaient pas la ponte, les œufs étant transformés dans l'abdomen en une masse noirâtre putréfiée. Les vols moururent en masse dix à quinze jours après les infestations. Les vols non infestés effectuèrent quatre pontes successives dans la même région, et, à mon arrivée en novembre, les bandes de jeunes criquets étaient très nombreuses et importantes, plusieurs couvraient des centaines d'hectares ; comme il s'agit d'une région agricole, tous les

champs furent entourés de barrières de zinc : les récoltes furent sauvées en totalité. J'infestai onze bandes sur toute l'étendue envahie, employant pour chaque bande une dizaine de litres de culture. L'épizootie se répandit peu à peu autour de chaque foyer ; une partie des criquets moururent avant d'avoir fini leur évolution, mais la majorité succomba pendant la dernière mue, ou dans les premiers jours de la vie ailée. Pratiquement, aucune sauterelle ne s'envola de la région (1).

2° *Reconquista.* — Une seule infestation eut lieu sur les sauterelles arrivant du Nord, près de Reconquista : le vol s'éleva le lendemain matin et alla mourir quelques jours après de l'autre côté du Parana, dans la province de Corrientes (2). Comme je l'ai dit, les jeunes sauterelles restent dans la région où elles sont nées pendant les vingt ou trente jours qui suivent la dernière mue ; c'est ce moment qui fut choisi pour infester la contrée, ce qui eut lieu dans la seconde quinzaine de janvier : une certaine mortalité fut constatée, mais l'immense majorité prit le chemin de l'Ouest et s'interna dans les provinces de La Rioja et Catamarca, où l'on trouva de nombreuses bandes malades ; les pontes eurent lieu d'une manière anormale et furent extrêmement réduites : la province de La Rioja fut visitée très soigneusement, on ne put trouver qu'une vingtaine de bandes de jeunes criquets, dont la plus importante ne mesurait pas deux hectares : dans toute la province, les inspecteurs d'agriculture évaluèrent l'étendue totale envahie à environ 35 hectares, c'est-à-dire que l'invasion fut nulle. Elle ne fut pas plus importante dans la province voisine de Catamarca, où l'on signala l'anéantissement complet de vols arrivant de l'Est (3).

3° *Région de Rio-Quarto.* — Cette région est entièrement agricole, l'observation des bandes y est donc très facile ; aucune infestation ne fut faite pour vérifier si la maladie se conservait d'une année à l'autre. Déjà, au commencement de novembre, j'avais noté la présence du coccobacille dans le cadavre de saute-

(1) Rapports de l'inspecteur de zone Tribodi et de l'inspecteur Barbesino, décembre et janvier 1912 et 1913.

(2) Rapport de l'inspecteur de Elia, 2 novembre 1912.

(3) Divers rapports, entre autres ceux de l'inspecteur de zone Tribodi et de l'inspecteur de Elia.

On trouva, entre autres, un vol de quinze kilomètres de longueur anéanti au lieu dit « Meseta del Calabozo », province de Catamarca.

relles trouvées mortes sur les lieux de ponte. Sur les bandes de jeunes criquets qui naquirent en novembre, on constata la présence de l'épizootie; la mortalité s'éleva jusqu'à 60 p. 100 avant l'époque de la dernière mue et se continua sur les vols constitués par les insectes qui purent achever leur évolution : on signala en effet une mortalité souvent très forte sur les vols regagnant le Nord ; des échantillons furent envoyés de divers points des provinces traversées pendant le voyage de retour : Cordoba, Mendoza, San Luis, San Juan, Rioja, Catamarca, Salta et Jujuy : le coccobacille spécifique fut isolé de tous les échantillons, il s'ensuivit que les pontes d'automne, d'ordinaire très importantes, furent extrêmement minimes : j'ai déjà cité le cas de la province de La Rioja où, jusqu'à l'année précédente, des milliers de kilomètres carrés étaient chaque année envahis, et qui ne compta en 1913 que 35 hectares.

Caloptenus. — Le *Caloptenus* du sud de la République Argentine, vulgo « tucura », est un insecte de petite taille d'environ 2 centimètres de longueur ; il est sédentaire ; l'éclosion a lieu fin septembre, il devient insecte parfait vers la fin d'octobre, pond au commencement de février et meurt en avril. Contrairement à ce qui a lieu pour les autres espèces de sauterelles, les pontes ne sont pas groupées, mais disséminées sur tout l'espace envahi. Ces insectes affectionnent principalement les champs de luzerne, qu'ils dévorent avidement : dès le mois de novembre, il ne reste plus que la tige dépouillée de toutes ses feuilles; leurs ravages accomplis, les sauterelles restent dans les mêmes champs, dévorant les jeunes bourgeons au fur et à mesure qu'ils se produisent : au bout de deux ou trois ans d'un tel traitement, les luzernières sont détruites et le sol complètement dénudé.

En novembre 1912, je me rendis à Chimpay, territoire du Rio Negro, région particulièrement envahie, et je commençai les infestations, qui furent continuées par M. le Dr Laure : les foyers durent être multipliés, les bandes ne se déplaçant pas. Un mois et demi après les premières infestations, une étendue de 50 kilomètres carrés, en fait toute la région infestée, était libre de sauterelles.

* * *

Colombie (1). — L'espèce qui ravage la Colombie est, d'après le mémoire cité, *Acridium peregrinum* (Syn. *Schistocerca peregrina* Oliv.). L'observation est juste, car, comme nous l'avons vu précédemment, le grand acridien migrateur américain est en tout semblable à celui de l'ancien continent : pour adopter la désignation réelle, il s'agit donc de *Schistocerca americana*.

En février 1913, le Gouvernement colombien reçut de l'Institut Pasteur des cultures du coccobacille des sauterelles et chargea deux commissions de vérifier si la méthode de destruction était pratiquement applicable en Colombie.

L'une des deux commissions, sous la direction du Dr Zea Urribe, opéra dans la région de Tocaima. Sous ce climat essentiellement tropical, l'exaltation de la virulence fut assez laborieuse, et après divers essais, le Dr Zea Urribe s'arrêta à la technique déjà signalée des cultures en bouillon intercalées entre chaque passage par sauterelle. Après 30 passages (15 par sauterelles, 15 par bouillon), le coccobacille fut isolé sur gélose et 3 litres de bouillon ensemencés avec des colonies pures.

Le 10 avril : après une pluie torrentielle de douze heures, à 6 heures du soir, pulvérisation des 3 litres sur une tache de criquet très clairsemée, et partant peu propre à la propagation de l'épizootie. Le 12 avril : très nombreux morts et malades; 14 avril : l'épizootie a gagné toute la tache.

Le 11 avril au soir, pulvérisation, avec 3 litres de bouillon de culture, d'une tache, également très clairsemée, de criquets. Une heure après la pulvérisation, une pluie abondante commence à tomber et dure toute la nuit. Le 15 avril, l'épizootie s'est étendue sur toute la tache, le sol est couvert de morts. On trouve des cadavres et des malades à une très grande distance des points infestés.

A la suite de ces expériences, où les conditions pour une

(1) Résumé du supplément n° 1, à la *Revue officielle du Ministère des Travaux Publics de la République de Colombie* « Langosta. Documentos relacionados con la historia, descripcion, tratamiento bacteriologico del prof. d'Herelle y su aplicacion en Colombia para la destruccion del acridio ». Año VII, n° 5 Bogota, mai 1913.

propagation rapide étaient très défavorables, la Commission adopta les conclusions suivantes :

1° Le coccobacille de d'Hérelle est un microbe pathogène pour la sauterelle; convenablement exalté, il détermine dans les bandes de ces insectes l'apparition d'une épizootie qui se propage et détermine leur destruction;

2° Le procédé du Dr d'Hérelle donne de bons résultats et peut se substituer avec avantage aux méthodes actuelles pour la lutte contre la sauterelle, surtout dans des pays comme la Colombie, où la population est faible et répartie sur un territoire très étendu;

3° Pour donner de bons résultats, il est nécessaire que les travaux soient conduits par un personnel technique composé de bactériologistes.

La seconde Commission, sous la direction du professeur F. Lleras, opéra dans la région de Guarduas. Pour exalter la virulence du coccobacille, le Dr Lleras opéra sur cinq séries d'une trentaine de sauterelles chacune ; il abandonna après quelques passages trois de ces séries, où l'exaltation ne se produisit pas assez rapidement. Les tableaux donnés par le Dr Lleras sont extrêmement intéressants en ce sens qu'ils indiquent clairement la nécessité absolue d'une technique minutieuse quand il s'agit d'exalter pour la première fois la virulence du coccobacille dans une contrée où les conditions climatériques sont différentes de celles d'où le microbe provenait originairement : quand l'acridien est de plus d'une autre espèce ou même d'un autre genre, les difficultés peuvent être encore augmentées. Si le Dr Lleras s'était arrêté aux trois premières séries, il aurait conclu à un échec : ces tableaux méritent d'être cités.

Le Dr Lleras appelle l'attention sur un fait que j'ai déjà cité : il existe dans l'intestin des sauterelles saines un coccobacille non pathogène qu'il faut bien se garder d'isoler au lieu et place du coccobacille spécifique : j'ai fait la même observation au Yucatan, dans la République Argentine, ainsi que sur des sauterelles mortes qui m'avaient été envoyées de Grèce.

Toutes les infestations dans les champs ont été faites avec du bouillon stérilisé à 100 degrés (procédé décrit précédemment et ensemencé avec des colonies isolées provenant de la série E.

NUMÉROS	DATES	HEURE	PASSAGE	NOMBRE de sauterelles.	DILUTION	LES PREMIÈRES meurent après :	LES DERNIÈRES meurent après :	DURÉE MOYENNE de la maladie.	NOMBRE de sauterelles mortes.	MORTALITÉ P. 100	OBSERVATIONS
							Série A.				
	Mars.					Heures	Heures.	Heures.			
1	19	9	1er	6	Pur	22	31 1/2	27	4	66	Bouillon de 8 jours.
2	20	9	2e	3	Pur	23	37 1/2	30	2	66	
3	21	8	3e	4	1/2	11	13	11 1/2	2	50	
4	21	23	4e	4	1/3	»	»	»	»	»	Après 50 heures aucune ne présentant de symptômes de la maladie, la série est abandonnée.
							Série B.				
1	19	21	1er	6	»	»	»	»	»	»	Avec bouillon de 24 heures. 72 heures après l'inoculation, les sauterelles ne présentent aucun symptôme ; la série est abandonnée.
							Série C.				
1	20	16	1er	12	Pur	22	28	25	5	42	Bouillon de 40 heures.
2	21	22	2e	5	Pur	10	20	15	2	40	
3	22	20	3e	7	1/2	60	»	60	2	29	Tenant compte de l'irrégularité et de l'intervalle considérable de temps écoulé entre l'injection et les premiers symptômes, la série est abandonnée.
							Série D.				
1	21	14	1er	14	Pur	12	18	15	12	85	Bouillon de 14 jours.
2	22	10	2e	15	Pur	21	22	21 1/2	8	53	
3	23	8 1/2	3e	20	1/2	24	27	25 1/2	10	50	
4	24	13	4e	15	Pur	13	19	16	10	66	
5	25	11	5e	12	1/2	10	12	11	10	83	
6	25	23	6e	15	1/3	15	17	16	11	73	
7	26	16	7e	15	1/4	7	10	8 1/2	15	100	
8	27	8 1/2	8e	24	1/5	6	8	7	24	100	
9	27	16 1/2	9e	13	1/6	10	14	12	13	100	
10	28	11 1/2	10e	12	1/7	7	13	10	12	100	
11	29	9	11e	20	1/8	5	23	14	17	85	
12	29	15	12e	10	Pur	9	12	10 1/2	10	100	
13	30	9	13e	16	1/4	7	9	8	16	100	
14	30	19 1/2	14e	23	1/5	6	8	7	23	100	
15	31	8 1/2	15e	30	1/6	3 1/2	6 1/2	5	30	100	
16	31	16 1/2	16e	30	1/8	2 1/2	8	5	30	100	
17	31	22 1/2	17e	25	1/10	3 1/2	11	7	25	100	
	Avril.										
18	1er	11	18e	25	1/10	3	8 1/2	6	25	100	
19	1er	21 1/2	19e	26	1/10	8	14	11	23	88	
20	2	16 1/2	20e	25	1/10	5	11	8	25	100	
21	3	13 1/2	21e	25	1/10	4	10	7	25	100	
22	3	22	22e	25	1/10	11	17	14	24	96	

NUMÉROS	DATE	HEURE	PASSAGE	NOMBRE de sauterelles	DILUTION du virus injecté.	LES PREMIÈRES meurent après :	LES DERNIÈRES meurent après :	DURÉE MOYENNE de la maladie.	NOMBRE de sauterelles mortes.	MORTALITÉ P. 100	OBSERVATIONS
						Série E.					
	Mars.					Heures.	Heures.	Heures			
1	24	10	1er	30	Pur	10	24	17	23	76	Culture de 70 heures.
2	25	10	2e	30	Pur	9	23	16	29	96	
3	26	9	3e	24	1/2	8	11	9 1/2	22	91	
4	26	9	4e	11	1/3	8	10	9	11	100	
5	27	10	5e	17	1/4	6	7 1/2	7	16	94	
6	27	20	6e	20	1/5	7	10	8 1/2	20	100	
7	28	14	7e	16	1/6	7	15	11	16	100	
8	28	23 1/2	8e	21	1/7	15	27	21	21	100	
9	29	9	8e	12	Pur	5	7	6	12	100	
10	29	16 1/2	9e	13	1/8	9	15	12	11	84	Du n° 9.
11	29	17 1/2	9e	11	1/6	8	14	11	10	91	Du n° 9.
12	30	9	10e	30	1/9	5	7	6	28	93	Du n° 10.
13	30	9	10e	13	1/10	5 1/2	7 1/2	6 1/2	13	100	Du n° 11.
14	30	16	11e	30	1/10	4 1/2	7	6	30	100	Du n° 12.
15	30	16 1/2	11e	30	1/10	5	8	6 1/2	30	100	Du n° 13. 1er isolement.
16	30	24	12e	17	1/10	8	11	9 1/2	17	100	Du n° 15.
17	31	1	12e	30	1/10	6	8	7	30	100	Du n° 14.
18	31	11	13e	30	1/10	5 1/2	9	7	30	100	Du n° 17.
19	31	14	13e	30	1/10	3	12	7 1/2	30	100	Du n° 16.
20	31	22	14e	30	1/10	6 1/2	15	11	25	100	Du n° 18.
	Avril.										
21	1er	9	14e	25	1/10	4 1/2	16	10	25	100	Du n° 19. 2e isolement.
22	1er	15	15e	25	1/10	5	10	8	25	100	Du n° 20.
23	1er	22 1/2	15e	25	1/10	7	11	9	23	97	Du n° 21.
24	2	10	16e	25	1/10	6	9 1/2	8	25	100	Du n° 22.
25	2	14 1/2	16e	25	1/10	5 1/2	10 1/2	8	25	100	Du n° 23.
26	2	22 1/2	17e	25	1/10	5 1/2	10 1/2	8	25	100	Du n° 24.
27	3	7 1/2	17e	25	1/10	5 1/2	8 1/2	7	25	100	Du n° 25.
28	3	14	18e	25	1/10	6	12	9	25	100	Du n° 26.
29	3	20	18e	25	1/10	5	11	8	24	96	Du n° 27.
30	4	9	19e	25	1/10	4	12	8	23	92	Du n° 28.
31	4	10	19e	25	1/10	6	13	9 1/2	25	100	Du n° 29.
32	4	22	20e	12	1/10	6	11	8 1/2	12	100	Du n° 31.
33	4	22 1/2	20e	12	1/6	4	9	6 1/2	12	100	Du n° 31.
34	5	14 1/2	22e	25	1/10	3	8	5 1/2	25	100	Du n° 33.

1er avril : bouillon de dix-neuf heures ensemencé avec isolement au 11e passage. Quatre bouteilles sont pulvérisées le soir, sur une tache de sauterelles adultes de 2 hectares de superficie ; le lendemain matin, quatre autres bouteilles sur la même tache.

5 avril : nombreuses sauterelles mortes et malades jusqu'à 1 kilomètre du point d'infestation.

6 avril : la tache prend son vol et va se poser à une vingtaine

de kilomètres (une demi-journée de marche) où elle laisse de très nombreux cadavres ; les survivantes sont contaminées, car un lot en apparence sain est mis en cage et toutes meurent après quelques heures avec les symptômes caractéristiques.

Le 1er avril, 8 bouteilles de bouillon sont ensemencées avec des colonies pures provenant d'isolement du 14e passage de la série E. Le 3 avril, 4 bouteilles sont pulvérisées le soir sur une tache de sauterelles très compacte. Le lendemain matin au lever du jour, pulvérisation avec les 4 autres bouteilles sur la même tache.

6 avril : les buissons sont couverts de sauterelles mortes et agonisantes.

7 avril : il ne reste que très peu de survivantes, toutes malades et présentant la diarrhée caractéristique : elles ne tardent pas à mourir. La tache entière a été anéantie en cinq jours.

Dans toutes les expériences, la cause de la mort a été vérifiée par isolement du coccobacille du contenu intestinal.

Les conclusions du rapport de la Commission ont été les suivantes :

1° Les cultures du coccobacille de d'Hérelle reçues de l'Institut Pasteur étaient vivantes et ont pu être exaltées au maximum;

2° Les caractères du coccobacille sont nets et correspondent exactement à ceux décrits dans les instructions remises par l'Institut Pasteur;

3° Le coccobacille d'Hérelle jouit d'un pouvoir pathogène considérable pour la sauterelle;

4° L'inoculation produit les symptômes et lésions décrits par d'Herelle;

5° Les cultures pulvérisées développent l'épizootie de coccobacillose dans les bandes de sauterelles qui sont détruites dans un temps relativement court;

6° Dans l'état actuel de nos recherches, on ne peut encore apprécier l'intensité ni l'extension de la contagion. Ces données ne pourront s'obtenir qu'après une campagne de plusieurs mois pendant lesquels les expérimentateurs suivront sans interruption les bandes contaminées jusqu'à confirmation de la con-

tamination de nouvelles bandes qui se seront mêlées aux malades;

7° D'après ce que nous avons observé, nous nous croyons autorisés à penser que, si le procédé s'implante dans le pays et si la campagne est bien dirigée, on obtiendra des résultats infiniment supérieurs à tout ce qui a été obtenu jusqu'à ce jour dans la destruction des sauterelles.

Depuis la publication de ce rapport, le Gouvernement colombien a créé une direction spéciale chargée d'effectuer des infestations sur tout le territoire de la République de Colombie : le Dr F. Lleras a été placé à la tête de ce service (1); de nombreuses infestations ont eu lieu et toutes ont donné des résultats analogues aux premières, de plus la propagation de l'épizootie à grande distance a été vérifiée. Après une expérience de plusieurs mois, la conclusion du directeur du Service des Infestations de Colombie est la suivante : une campagne d'infestations soutenue et bien conduite est l'unique moyen capable de détruire les sauterelles.

J'ai donné quelques détails sur les résultats obtenus en Colombie, cette République étant le premier pays essentiellement tropical qui met en œuvre le procédé des infestations, tous les autres étant situés dans les zones tempérée ou subtropicale.

* * *

Chypre. — La sauterelle de l'île de Chypre appartient à l'espèce *Stauronautus maroccanus*; c'est donc un petit migrateur. Extrêmement nombreuses il y a quelques années encore, leur nombre a beaucoup diminué, grâce aux mesures prises par le Gouvernement anglais, maintenant possesseur de l'île : comme il s'agit d'une île, c'est-à-dire d'un territoire très limité, pourvu d'une population relativement dense, les moyens mécaniques ont donné d'assez bons résultats, mais, malgré tout, il reste encore quelques bandes qui font leur apparition chaque printemps. En février 1913, le Gouvernement de l'Ile reçut de l'Institut Pasteur des tubes de culture du coccobacille des sauterelles,

(1) Lettre personnelle du Dr F. Lleras, 11 septembre 1913.

qui furent remis au bactériologiste M. Harris, chargé des expériences. La virulence convenable fut obtenue avec l'une des cultures reçues après douze passages par jeunes staronautes, pour un second tube après neuf passages seulement (1). Les bandes infestées par du bouillon ensemencé avec des colonies pures provenant d'isolement du contenu intestinal de la douzième série se contaminèrent rapidement; cinq jours après les infestations, la mortalité s'élevait à 40 p. 100, et des sauterelles mortes et malades se rencontraient à une grande distance des points infestés. Il ne semble pas que les bandes aient été suivies plus longtemps : tout au moins le rapport cité n'en parle pas. La conclusion est que :

Le coccobacille est pathogène pour *Stauronautus maroccanus*:

Le procédé des infestations est d'un grand secours pour la destruction des sauterelles et l'expérience prouve qu'il est efficace dans le cas où les autres méthodes de destruction ne donnent aucun résultat.

* * *

Algérie. — Quelques expériences ont été faites par le Dr Sergent (2), en avril et mai 1913, sur une bande assez clairsemée de stauronautes qui se trouvait près de Tiaret. L'épizootie se propagea parfaitement : on trouva de nombreux cadavres sur une grande étendue; en certains points, leur nombre était même considérable; malgré tout, l'épizootie se propagea lentement et une partie de la bande infestée put s'envoler, mêlée avec une autre bande venant de Saïda et qui s'était réunie à elle : il fut impossible de suivre le vol; on signala bien quelque temps après qu'une bande entière était morte dans la commune du Djebel Nador, à une centaine de kilomètres de là, sans qu'il fût possible de savoir s'il s'agissait bien du vol infesté. Vu le petit nombre de sauterelles qui apparurent cette année en Algérie, on ne put répéter l'expérience.

(1) Rapport du « Government Analyst », à S. E. le Gouverneur de l'île de Chypre, 21 juin 1913.

(2) Voir plus loin le Mémoire déjà cité du Dr Sergent.

V

ORGANISATION PRATIQUE DE LA LUTTE

La manière d'opérer sera un peu différente suivant les régions où l'on sera appelé à opérer. Nous allons examiner successivement tous les cas qui pourront se présenter : application dans des régions pourvues de moyens de communications rapides et régions qui en seraient dépourvues, chacun de ces deux cas se subdivisant en contrées agricoles et contrées désertes.

Régions pourvues de voies de communication. — L'organisation doit comprendre un laboratoire central et des groupes mobiles chargés des infestations.

Je n'insisterai pas sur la partie laboratoire : il doit être monté comme tout autre laboratoire de bactériologie. Si le pays envahi par les sauterelles est étendu, il y aurait lieu de joindre au laboratoire une installation pour produire en grande quantité les milieux de culture : en plus du bouillon employé pour la lutte contre la sauterelle, on pourra y fabriquer éventuellement tous les autres milieux de culture pour les virus destinés à l'agriculture.

Les appareils nécessaires pour la fabrication en grand des bouillons doivent comprendre :

Une petite chaudière à vapeur pour la stérilisation des appareils ;

Une ou deux marmites à chauffage par double fond pour la préparation du bouillon ;

Un autoclave à vapeur, du genre de ceux qui sont employés pour l'industrie des conserves ;

Les ustensiles ordinaires : entonnoirs, louches, écumoirs, seaux, etc.

Pour envaser le bouillon, les récipients les plus pratiques sont des bouteilles analogues à celles qui servent à contenir l'eau oxygénée Merck ou Poulenc, d'environ un litre de capacité ; il faut toutefois remarquer qu'il est préférable d'employer des bouteilles en verre spécial supportant la température de stérilisation (celles, par exemple, qui figurent sous le n° 3.293 du catalogue Adnet, de Paris, ou tout autre analogue). On aura soin

de se procurer en même temps un lot assez considérable de rondelles de caoutchouc de rechange, car elles se détériorent rapidement. Le nombre de bouteilles variera naturellement avec l'importance des infestations.

Pour le transport, il est pratique d'employer de petits coffres solides, fermés par un cadenas, pouvant contenir six litres : ils sont munis de séparations intérieures pour faciliter l'emballage et éviter la casse pendant le transport. Chaque caisse doit porter un numéro d'ordre, de manière à pouvoir tenir une comptabilité en règle et savoir, à un moment donné, ceux qui n'ont pas retourné les caisses et bouteilles vides après emploi.

Chaque litre est rempli du milieu de culture préféré, bouillon peptonisé ordinaire, solution de peptone glucosée et gélatinée simple ou à la pomme de terre : une expérience préliminaire permettra de voir le milieu qui convient le mieux, eu égard au pays et à l'espèce de sauterelle : les formules ont été données précédemment. Le bouchon et le col sont enveloppés de coton cardé recouvert d'un capuchon de papier parcheminé maintenu par une ficelle enroulée autour du col. Les bouteilles sont stérilisées soigneusement pendant une heure à 120 degrés.

La stérilisation est une opération qui doit être surveillée de très près : le bactériologiste chargé des infestations pourrait se voir dans un moment pressé en possession d'un lot de milieu de culture putréfié si la stérilisation avait été mal faite. Pour éviter un pareil contre-temps, il sera bon de placer dans une bouteille de chaque série un index qui permettra de se rendre compte de la température réellement atteinte par le liquide (1).

(1) *Technique microbiologique*, par A. Besson, 4e édition, p. 13. « Pour pouvoir contrôler les températures, on peut utiliser... des indicateurs fusibles : tubes de verre scellés, contenant des substances fondant entre 110 et 121 degrés ; le benzonaphtol fond à 110 degrés, l'antipyrine et le soufre à 113 degrés, la résorcine à 119 degrés, l'acide benzoïque à 121 degrés. Un procédé élégant (Demandre) consiste à ajouter au corps fusible pulvérisé une faible quantité d'une matière colorante, dont la présence reste masquée à l'état pulvérulent, mais qui est dissoute lors de la liquéfaction et colore le culot obtenu par refroidissement. Les deux formules suivantes correspondent aux besoins ordinaires :

Pour la température de 100 degrés.	Benzonaphtol	100 gr. »
	Safranine	0 gr. 01
Pour la température de 121 degrés.	Acide benzoïque	100 gr. »
	Vert brillant	0 gr. 01

« Une petite quantité du mélange pulvérulent est scellée dans une ampoule en verre ».

Infestations. — Dans aucun cas, les employés chargés de la lutte défensive ne doivent s'occuper des infestations : si l'on exigeait d'eux qu'ils s'occupassent à la fois de la pose des barrières, de la protection des cultures et des infestations, il en résulterait infailliblement que l'un ou l'autre travail serait négligé. Pour éviter tout contre-temps et tout aléa, toujours dangereux quand il s'agit de sauterelles, il y a lieu de prévoir deux organisations indépendantes :

L'organisation actuelle de la plupart des régions envahies par les acridiens, qui continuera comme par le passé à s'occuper de la défense des cultures ;

L'organisation d'un personnel spécial uniquement chargé des infestations, qui se composera, suivant l'étendue du pays, de un ou plusieurs groupes, comprenant chacun cinq à six employés sous les ordres d'un bactériologiste.

Avant l'époque de l'arrivée des vols, des ordres doivent être donnés aux autorités locales, pour qu'aussitôt qu'un vol se présente, il soit de suite signalé par télégraphe au laboratoire central.

Aussitôt qu'une région est envahie, un groupe y est envoyé en même temps qu'un certain nombre de caisses de bouillon. Arrivé sur les lieux, le bactériologiste exalte la virulence du coccobacille, et, pendant les trois ou quatre jours que dure cette opération, il prend tous les renseignements qui peuvent lui être utiles, envoie ses employés reconnaître la situation et l'importance des vols, en un mot prend contact avec la région pour être prêt à agir aussitôt que le virus est suffisamment actif : il ensemence alors les bouillons, et envoie ses employés procéder aux infestations. Il devra avoir soin de ne pas négliger de parcourir lui-même la contrée et de surveiller attentivement les infestations : j'ai observé que les bactériologistes que j'ai eus sous mes ordres avaient tendance à se confiner dans leur laboratoire et à considérer les pulvérisations comme un travail manuel absolument secondaire : c'est une erreur, et, pour obtenir les meilleurs résultats, il est indispensable que les infestations soient faites intelligemment et méthodiquement.

Pour la campagne contre le criquet, les lieux de ponte étant connus d'avance comme importance et position, il sera facile de réunir à proximité de ces endroits un stock de bouillon suf-

fisant. Le bactériologiste aura le loisir, durant le temps de l'incubation, de visiter toute la région, ce qui le mettra à même de disposer ses employés dans les endroits qu'il saura d'avance devoir être envahis ; quand les criquets seront nés, il n'aura qu'à ensemencer les bouillons qu'il remettra aux employés ; ce travail ne lui demandant guère qu'une heure par jour, il aura également le temps de faire des tournées de surveillance.

Dans le cas où, le pays étant vaste, il y aurait lieu de constituer plusieurs groupes, l'organisation se compléterait par un bactériologiste chef qui dirigerait la campagne d'infestation, répartirait les divers groupes, centraliserait les informations, surveillerait la fabrication des bouillons au laboratoire central, et au besoin irait faire les inspections nécessaires au cours de la campagne. Il devrait également maintenir le bacille continuellement virulent pour parer à toute éventualité et être à même de l'expédier de suite où le besoin s'en ferait sentir, et vérifier la présence du coccobacille dans les cadavres de sauterelles qui pourraient lui être expédiés des diverses parties du pays pour vérification de la propagation de l'épizootie.

Ensemencements. — La question de l'exaltation de la virulence et celle de l'ensemencement ont été traitées en détail, inutile d'y revenir. Pour la pratique de ces opérations en campagne, un laboratoire est inutile. Le bactériologiste devra se munir des objets suivants, qui répondront à tous les besoins :

Six cages en toile métallique pour garder les sauterelles en expérience pour l'exaltation de la virulence. On peut remplacer ces cages par des couvre-plats en toile métallique ;

Une seringue à injections de un centimètre cube munie de très fines aiguilles ;

Quelques verres de montre ;

Une lampe à alcool ;

Quelques pipettes en verre ;

Un fil de platine pour les ensemencements ;

Des tubes de bouillon peptonisé gélosé ordinaire qui lui seront envoyés du laboratoire central. Si les tubes contenaient de l'eau de condensation, il faudrait avoir soin de la retirer aseptiquement avec une pipette, de manière à ce que les

cotons ne soient pas mouillés pendant le transport. Avoir soin de capuchonner les tubes.

Les bouillons devront être ensemencés avec un virus aussi exalté que possible, et purement ; il est facile de voir au moment des infestations si cette dernière condition a été remplie ; le bouillon ne doit pas avoir une mauvaise odeur, simplement une odeur forte de bouillon, dans le cas contraire il serait contaminé et devrait être rejeté.

Régions agricoles. — Nous avons expliqué que la maladie se répand plus ou moins rapidement suivant que les circonstances sont favorables ou défavorables, mais en tout cas il ne faut pas espérer obtenir la disparition d'une bande dans un temps inférieur à une dizaine de jours ; si les conditions sont défavorables, ce qui est assez souvent le cas pour les régions agricoles où la nourriture est abondante, la destruction pourra demander de vingt à trente jours s'il s'agit de criquets, plus longtemps même si les insectes sont adultes. L'on comprend aisément que dans une zone cultivée les bandes auraient le temps de causer des dégâts importants avant d'être détruites. La lutte au moyen du coccobacille, j'insiste sur ce point, doit être considérée comme une arme offensive, permettant d'arriver pratiquement à la disparition des invasions, mais ne doit jamais être employée comme moyen de lutte directe, de protection, sous peine de déboires. Il faut protéger les cultures par les moyens employés jusqu'ici ; mais, indépendamment de ces moyens de défense, il faut infester le plus grand nombre de bandes possible au moyen du coccobacille. Les sauterelles qui échappent aux moyens de lutte directe, et l'on sait si elles sont nombreuses, mourront peu à peu de l'épizootie. Un autre avantage des infestations dans les régions agricoles, c'est que les bandes où l'épizootie s'est déclarée se déplacent ordinairement plus lentement que les bandes saines, et de plus, elles mangent moins et commettent par conséquent moins de dégâts.

Pendant la campagne dans la région de Rafaéla en 1912-1913, comme je l'ai déjà dit, onze bandes seulement ont été infestées ; cela a suffi pour que la maladie se propageât dans tous les districts voisins avant le départ des vols, le résultat final fut l'extermination totale des sauterelles dans la zone envahie.

Régions incultes. — Ici, par suite du manque de main-d'œuvre, la lutte par les moyens mécaniques est impossible, et, si on tente de l'appliquer, les résultats sont illusoires et hors de proportion avec les fortes dépenses occasionnées; on n'arrive souvent pas à détruire la millième partie des sauterelles présentes; ces régions sont toujours couvertes de brousses ou de forêts qui sont des abris sûrs pour les insectes.

Dans les régions non agricoles, peu importe que les sauterelles meurent après dix jours ou après un mois : l'infestation est le seul procédé à employer.

Il faudra, comme toujours, infester le plus grand nombre de bandes possible de manière à multiplier les foyers sur toute l'étendue de la zone envahie. Il est certain que, vu la configuration générale de ces contrées, bien des bandes échapperont à l'infestation directe; elles se contamineront presque certainement par voie naturelle, car dans un district envahi les bandes en marche auront grande chance de croiser le chemin suivi par des bandes déjà infestées, ou même de se réunir aux restes de ces bandes.

Régions privées de voies de communication. — Ces régions sont toujours des régions incultes, où tout au moins les cultures y sont de peu d'importance, d'ailleurs, le voudrait-on, on ne pourrait pratiquer la lutte défensive; la barrière de zinc étant d'un transport difficile dans une contrée sans chemins de fer. On pourra essayer de protéger les cultures locales au moyen de fossés, qui, suivant les terrains, donnent parfois d'assez bons résultats. En tout cas l'effort principal portera sur les infestations.

La réception des milieux de culture d'une fabrique centrale serait extrêmement coûteuse; il est de beaucoup préférable de fabriquer le bouillon de culture sur place par des moyens simples.

Le matériel suivant, facilement transportable dans n'importe quelle région, suffira pour la fabrication d'une cinquantaine de litres par jour :

Trois marmites de fort fer battu ou en cuivre étamé, respectivement de 100, 80 et 60 litres, disposées pour rentrer l'une dans l'autre pour le transport;

Un récipient en forme de boîte à lait d'environ 12 litres ;

Un lot de papier à filtre ;

Deux grands entonnoirs en métal, un écumoir et une louche ;

Du papier réactif bleu et rouge ;

Un flacon de soude caustique (en cas de besoin on peut remplacer par de la cendre de bois) ;

Du sel ordinaire.

Un petit hache-viande.

Un lot de peptone, Chapoteaut de préférence, en quantité suffisante pour la durée de la campagne. Si ce produit venait à manquer, et si l'on ne pouvait s'en procurer sur place, il ne faudrait pas pour cela interrompre les infestations ; le coccobacille pousse dans le bouillon simple, quoique moins abondamment que dans le bouillon peptonisé ;

Un lot de bouteilles semblables à celles que j'ai précédemment décrites ; vu la difficulté qu'il y aurait à remplacer les bouteilles cassées, il faudrait absolument se procurer des récipients en verre résistant à la température de stérilisation, et les éprouver de plus avant le départ. Ne pas oublier les rondelles de caoutchouc de rechange.

De plus, naturellement, les quelques appareils décrits pour l'exaltation de la virulence ; on devra se pourvoir d'un bon lot de tubes de gélose capuchonnés pour ne pas se trouver à court au milieu de la campagne.

On peut employer le bouillon glycosé gélatiné qui a été décrit, il n'est pourtant pas à recommander dans ce cas particulier ; vu la quantité élevée de peptone qu'il contient, il faudrait se munir d'une grande quantité de ce produit, et de plus l'unique avantage de ce milieu de culture est de conserver plus longtemps la virulence, chose qui n'a ici aucune importance puisqu'il sera toujours indispensable d'employer de suite le bouillon ensemencé à cause de sa stérilisation défectueuse, qui ne permet pas la conservation.

Dans la marmite de 80 litres, mettre 20 kilogrammes de viande maigre hachée (viande de bœuf, de veau, de mouton, de chèvre, de gibier ou de volaille suivant les ressources locales), 50 litres d'eau, 250 grammes de sel ; laisser macérer deux ou trois heures ; recueillir cinq à six litres de la partie liquide que l'on conservera à part ; faire bouillir le reste pen-

dant une demi-heure; passer sur un linge dans la marmite de 60 litres, ajouter 250 grammes de peptone; laisser reposer quelque temps pour que la température tombe à environ 50 degrés; ajouter la quantité de liquide clair que l'on a séparé avant l'ébullition; alcaliniser légèrement et faire bouillir une demi-heure en écumant: le bouillon est alors limpide; filtrer et répartir dans les bouteilles.

Pour la stérilisation placer dans le fond de la marmite de 100 litres une couche de paille, ou mieux un vieux sac, placer les bouteilles remplies et bien bouchées verticalement les unes à côté des autres; remplir la marmite d'eau jusqu'à la hauteur des bouchons, couvrir la marmite et faire bouillir une heure à grand feu. La marmite ne contient que 25 bouteilles; deux opérations sont nécessaires pour stériliser les 50 litres.

Le bouillon stérilisé le soir sera laissé à refroidir jusqu'au lendemain matin, puis ensemencé aseptiquement; on l'utilisera le soir du même jour ou le lendemain au plus tard; le surlendemain il serait presque sûrement contaminé.

En opérant comme il a été décrit, les résultats sont les mêmes qu'avec du bouillon fait au laboratoire.

Avant la campagne il faudra déterminer sur la carte l'aire d'opération de chaque groupe et choisir un certain nombre de stations réparties sur toute l'étendue à infester. Chaque station sera visitée tour à tour; on y fabriquera le bouillon de culture, et les employés rayonneront autour de ce centre pour faire les infestations; de cette manière il sera possible d'effectuer méthodiquement l'infestation de toute la région. En règle générale il vaudra mieux diviser le pays en un assez grand nombre de districts qui seront successivement visités, et où on séjournera peu de temps, que de choisir seulement quelques centres avec séjours prolongés dans chacun d'eux; dans le premier cas la surveillance des employés sera plus facile, le travail de ceux-ci moins pénible à cause des distances moindres à parcourir pour rayonner dans le district, et les infestations auront plus de chances d'être conduites méthodiquement.

Quelle que soit la région où il sera appelé à opérer, le bactériologiste devra s'appliquer à étudier les mœurs de l'insecte contre lequel il est appelé à lutter, ce qui lui permettra de trouver les meilleures conditions possibles pour obtenir le

résultat cherché dans un minimum de temps; il devra surtout avoir bien présent à l'esprit que, plus une espèce est sédentaire, plus les foyers devront être multipliés; pour *Schistocerca*, un foyer par 10 kilomètres carrés peut parfois suffire, pour le *Caloptenus* du Sud de l'Argentine, il en faudra plusieurs par hectare. Pour chaque espèce de sauterelle, la propagation de l'épizootie aura lieu plus ou moins rapidement eu égard aux mœurs de l'insecte, et la disparition des bandes se produira après un laps de temps par conséquent très variable; trop de facteurs entrent en ligne de compte pour qu'il soit possible d'énoncer une règle qui s'appliquerait dans tous les cas.

ESSAI
DE DESTRUCTION DES SAUTERELLES EN ALGÉRIE
PAR LE
« COCCOBACILLUS ACRIDIORUM » DE D'HERELLE

par Edmond SERGENT et Albert LHÉRITIER.

(Institut Pasteur d'Algérie.)

Lorsque d'Hérelle isola, en 1910, d'une épizootie sévissant sur les Sauterelles du Mexique, un Coccobacille très pathogène pour ces insectes, il conclut « qu'il serait peut-être intéressant d'essayer de provoquer des épizooties dans les pays qui souffrent des déprédations des Sauterelles, en utilisant le Coccobacille de l'épizootie du Yucatan (1) ». Il put lui-même pratiquer un premier essai de ce genre, en 1911-1912, dans la province de Santa-Fé, en Argentine, et constata un plein succès (2).

Il était donc indiqué d'expérimenter ce virus contre les Sauterelles dont les invasions causent, certaines années, tant de dommages à l'Algérie. Les Sauterelles dévastatrices appartiennent, en Algérie, à deux espèces :

Schistocerca peregrina Olivier, ou Sauterelle pèlerine, dont le point de départ semble être au Soudan, et *Stauronotus maroccanus* Thunberg, qui est autochtone, et qui effectue ses pontes dans les steppes pierreux de l'hinterland nord-africain (3).

(1) F. d'Hérelle, Sur une épizootie de nature bactérienne sévissant sur les Sauterelles au Mexique, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CLII, n° 21, 22 mai 1911, p. 1413.

(2) F. d'Hérelle, Sur la propagation, dans la République Argentine, de l'épizootie des Sauterelles du Mexique. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CLIV, n° 9, 26 février 1912, p. 623.

(3) Voir un excellent résumé de la question dans Ch. Rivière et H. Lecq, *Manuel pratique de l'Agriculteur algérien*, p. 848.

Consulter pour les détails le gros ouvrage de J. Künckel d'Herculais, *Invasions des Acridiens, vulgo Sauterelles, en Algérie*, 1893-1905.

Depuis 1908, *Schistocerca peregrina* n'a pas fait d'apparition notable dans le Tell algérien et nos expériences ont dû porter sur le Stauronote marocain dont les colonies nombreuses se multiplient depuis quelques années, sur les Hauts-Plateaux oranais, dans la région de Saïda-Frenda-Tiaret.

Les conditions du problème en Algérie présentent les différences suivantes avec celles que rencontrèrent l'observation au Yucatan et l'expérimentation en Argentine :

1° Conditions climatologiques différentes.

2° Conservation prolongée du virus *in vitro*, ce qui en atténue la virulence;

3° En Amérique les espèces d'Acridiens infectés par le virus d'Hérelle appartenaient au genre *Schistocerca* : *Schistocerca pallens* Thunberg au Mexique, *Schistocerca paranensis* Burm. en Argentine, ces deux espèces n'étant d'ailleurs peut-être pas distinctes ni l'une ni l'autre de l'ubiquitaire *Schistocerca peregrina*. En Algérie nous avons affaire pour le moment à *Stauronotus maroccanus* Thunberg. Cette espèce, beaucoup plus petite que les *Schistocerca*, a des mœurs très différentes.

Trois questions se posaient en Algérie :

1° Est-il possible de porter la virulence du Coccobacille de d'Hérelle vis-à-vis du Stauronote marocain à un degré suffisant?

2° Peut-on contaminer les gîtes ou la pâture des Stauronotes par simple pulvérisation de cultures de Coccobacilles?

3° Ce second point acquis, les Stauronotes infectés peuvent-ils contaminer leurs congénères, et créer ainsi une épizootie suffisamment meurtrière?

Ce sont ces trois points que nous allons étudier.

I

EXALTATION DE LA VIRULENCE DU COCCOBACILLE

Nous avons cherché à obtenir cette exaltation de la virulence de la bactérie, comme d'Hérelle, par la méthode pastorienne du passage successif du virus par une série d'insectes de l'espèce dont nous voulions vaincre la résistance.

Ainsi que l'indique d'Hérelle, nous inoculions les cultures au défaut d'un des premiers anneaux de l'abdomen. Nous avons apporté à sa technique les modifications suivantes : au lieu de seringues et d'aiguilles, nous employons des pipettes Pasteur. Nous choisissons des pipettes à effilures fines, et nous réeffilons une seconde fois, dans la flamme d'une veilleuse l'effilure, en lui faisant faire un angle de 40 degrés environ avec la direction de la pipette. Avec ces effilures capillaires extrêmement fines nous arrivons à inoculer des Criquets nouveau-nés de 4 à 5 millimètres de longueur totale.

Au lieu d'utiliser la gouttelette fécale pour les inoculations et ensemencements, nous préférons prélever l'exsudat moins impur de la cavité générale : il suffit de couper une patte de l'insecte : la pression du thorax, puis de l'abdomen, fait sourdre à la surface de section une gouttelette trouble où le Coccobacille pullule, à l'état de pureté presque toujours. Cette technique permet de rechercher le Coccobacille dans l'organisme du Criquet, même pendant la vie.

Ayant fait alterner, à un moment donné, les cultures sur gélose et les inoculations aux Acridiens, dans le but d'économiser ceux-ci et d'éviter le travail de nuit, nous nous sommes aperçus que cette alternance produisait les plus heureux effets sur l'exaltation de la virulence du Coccobacille : un Acridien inoculé au milieu de la journée mourait vers le soir, une anse de son liquide de cavité générale était ensemencée par stries sur plusieurs tubes de gélose inclinée : le lendemain on choisissait une colonie isolée que l'on inoculait à de nouveaux Acridiens, etc. De ce moment data une fixité particulière de la virulence du Coccobacille.

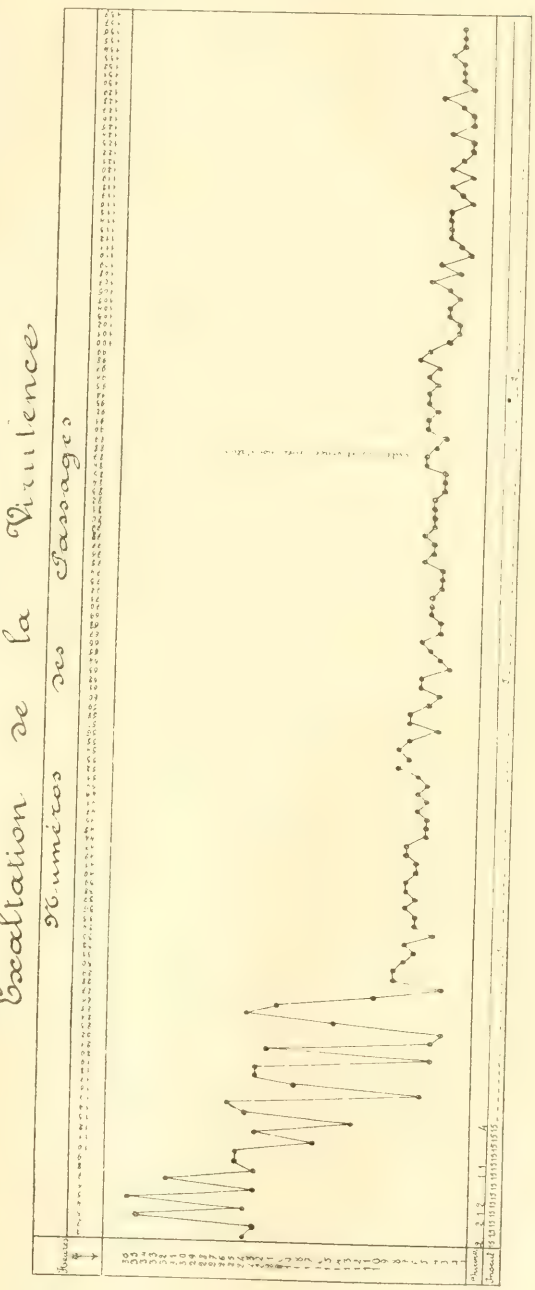
Les premières inoculations furent faites sur de très jeunes Criquets nés depuis quelques jours seulement, les dernières se poursuivent sur des adultes : il est impossible de dire si les Criquets sont plus résistants que les Sauterelles, car celles-ci reçoivent un virus exalté par de nombreux passages par l'organisme de ceux-là. Il semble bien que la mue constitue une période critique pendant laquelle l'insecte est moins résistant à l'infection.

L'intestin des jeunes Criquets, jusqu'à l'âge de trois semaines au moins, est presque toujours dépourvu de germes, du moins d'après ce que montrent l'examen microscopique et les ensemencements en milieux aérobies ordinaires. Nous ne trouvâmes que rarement une très grosse bactérie en bâtonnet, immobile, et quelquefois un infusoire. Chez les Sauterelles adultes la flore intestinale se développe : on trouve surtout un Coccobacille court, immobile, ne prenant pas le Gram, donnant sur gélose de belles colonies porcelainées, et ne paraissant pas pathogène spontanément pour les Stauronotes.

Dans le but d'obtenir le plus vite possible l'exaltation du virus, pour expérimenter celui-ci avant que les Acridiens aient

commencé leurs ravages, nous avons essayé de faire éclore avant terme les œufs d'Acridiens. Le 23 février 1913, M. l'administrateur Tondu, dont l'amicale et compétente collaboration nous a été d'un grand prix, nous envoie des coques ovigères de Stauronotes, que nous divisons en 4 lots placés, le 26 février, à 4 températures différentes :

à 37,5 degrés,
à 24-26 degrés,
à 19-22 degrés,
à 14-18 degrés.



Les œufs à 37,5 degrés n'ont jamais éclos.

Les œufs à 24-26 degrés ont éclos le 3 mars (après 5 jours).

Les œufs à 19-22 degrés ont éclos le 11 mars (après 13 jours).

Les œufs à 14-18 degrés ont éclos le 19 mars (après 21 jours).

Dans les localités d'où provenaient ces coques ovigères, les éclosions ont commencé dans la dernière semaine de mars, ont été le plus nombreuses en avril et se sont prolongées jusqu'en mai.

On peut donc hâter l'éclosion des œufs d'Acridiens en les exposant à une tem-

pérature de 24-26 degrés, et il sera peut-être utile de recourir à cet artifice pour se procurer, avant chaque nouvelle campagne, le matériel nécessaire à l'exaltation de la virulence microbienne, atténuée par la vie hivernale *in vitro*.

*
* *

Les *Stauronotes marocains* se montrèrent assez résistants à l'infection par le *Coccobacillus acridiorum*. Parmi les premiers inoculés un certain nombre mouraient en 24-36 heures, tandis que d'autres résistaient et survivaient indéfiniment. Si on sacrifiait ces Stauronotes réfractaires au bout de quelques jours, on en trouvait qui étaient absolument amicrobiens, tandis que d'autres contenaient dans leur intestin, et même dans leur cavité générale, des Coccobacilles assez nombreux ne paraissant influer en rien sur leur état de santé. Après le treizième passage du virus, aucun Acridien inoculé ne survécut.

Aux premiers passages, le virus tuait les Criquets en 23-36 *heures* en moyenne (survivants non comptés). Ce n'est qu'au 28e passage que la moyenne de la durée de la vie chez les Criquets inoculés tomba, pour ne plus remonter, à environ *sept heures*. On sait que d'Hérelle tuait les *Schistocerca* en 5-7 heures dès les 5-10e passages. Le Stauronote s'est donc montré plus résistant que le *Schistocerca*.

Au 70e passage, la moyenne de la durée de l'infection tombait à 6 heures, et au 100e passage, à quatre heures.

Il a fallu vingt jours pour obtenir une mortalité régulière en sept heures, un mois pour l'obtenir en six heures et sept semaines pour l'obtenir en quatre heures en moyenne.

Plusieurs dizaines de Criquets et de Sauterelles de tout âge furent injectés, pour servir de témoins, avec des quantités de bouillon ou d'eau physiologique égales aux quantités de cultures injectées aux Acridiens de passage, et suivant la même technique; aucun de ces témoins ne mourut au cours d'une observation de plusieurs semaines.

II

CONTAMINATION DIRECTE, PAR PULVÉRISATION, DES TACHES D'ACRIDIENS

1° Essais de laboratoire.

En même temps que, par inoculations successives à des séries de Sauterelles, nous exaltions la virulence du Coccobacille américain pour les Stauronotes marocains, nous expérimentions les modes naturels de contamination de ces insectes : en premier lieu la contamination par ingestion.

Onze Criquets reçoivent *per os* une émulsion des Coccobacilles du 6e passage (liquide de la cavité générale et gouttelette fécale). Dix survivent indéfiniment, 1 seul meurt le 9e jour, son intestin et sa cavité générale sont remplis de Coccobacilles. Cinq Criquets reçoivent de la même façon, *per os*, des Coccobacilles du 17e passage, 3 survivent, 2 succombent en 20 et 23 heures.

Si l'on dépose le virus, non pas directement sur l'armature buccale des insectes, comme dans l'expérience précédente, mais sur les herbes qui leur servent de pâture, on obtient des résultats analogues : des déjections de Criquets du 17e passage sont déposées sur l'herbe d'un bocal où sont placés cinq Criquets. Deux de ces Criquets meurent en 23 heures avec des Coccobacilles dans la cavité générale et l'intestin.

Nous avons voulu voir si des Criquets pouvaient se contaminer en dévorant des cadavres de Criquets infectés : 9 cadavres frais de Criquets du 17e passage sont placés dans un bocal dépourvu de toute autre nourriture et contenant 10 Criquets à jeun depuis la veille. C'est seulement au bout de 24 heures que les Criquets commencent à dévorer les cadavres. Quatre d'entre eux meurent en deux jours, trois en trois jours, tous avec de très nombreux Coccobacilles dans leur intestin et leur cavité générale. Les autres moururent non infectés.

En somme, les Stauronotes, Criquets ou Sauterelles, ne paraissent pas avoir beaucoup de disposition pour le cannibalisme : nous ne les avons jamais vus se dévorer les uns les autres dans les champs, et nous n'avons pu les faire se nourrir de cadavres d'autres Stauronotes dans les cages qu'en les privant pendant au moins 48 heures de toute autre espèce de nourriture.

D'autre part, nous nous sommes demandé si le contact du virus avec la surface du corps, la possibilité de l'ingestion étant écartée, pouvait contaminer les insectes : pour le voir, nous avons frotté soigneusement l'abdomen seul de trois Criquets avec du virus du 17e passage, aucun d'eux ne s'est contaminé.

En résumé les Criquets peuvent s'infecter par ingestion de virus (cultures pures ou bien déjections de malades), bien que

dans les expériences une forte proportion échappent à la contamination. Les Stauronotes, paraissant peu cannibales, ne semblent pas devoir s'infecter souvent par l'ingestion de cadavres contaminés. Enfin le contact du virus à la surface du corps ne semble pas, d'après les premières expériences, être un mode d'infection des Acridiens.

Tolérance pour le parasitisme. — De très nombreux Criquets ou Sauterelles, inoculés au laboratoire, ou capturés dans la nature près des champs d'expériences, et possédant l'apparence d'un très bon état de santé, contenaient de nombreux Coccobacilles dans leur intestin, et parfois même dans leur cavité générale. L'examen d'une gouttelette de liquide de la cavité générale, obtenue par l'amputation d'un fragment de patte, permit plusieurs fois de constater l'infection de Criquets inoculés, qui survécurent. Ils semblent tolérer parfaitement leurs parasites.

Immunité acquise. — Sept Criquets ayant survécu à l'inoculation de virus provenant des premiers passages, et par suite peu virulent, furent réinoculés avec des Coccobacilles plus virulents après un espace de temps variant de 3 à 7 jours : 4 succombèrent à cette nouvelle inoculation, en présentant de nombreux Coccobacilles dans leur organisme (1 en 19 heures, 1 en 24 heures, 2 en 2 jours). Les trois autres survécurent.

Castration parasitaire. — Dans des vols de Sauterelles s'étant déjà accouplées, et comprenant des porteurs de germes, nous ne trouvâmes qu'un petit nombre de femelles pleines d'œufs : beaucoup n'avaient pas d'œufs. Il est impossible, en l'absence de tout élément de comparaison, de savoir si le fait est anormal. Il a toutefois frappé M. l'administrateur Tondu, qui a eu à diriger des campagnes contre les Sauterelles depuis plus de 20 ans. On peut en retenir la simple indication de recherches à poursuivre dans l'avenir pour déterminer si des insectes tolérant en apparence leurs parasites ne seraient pas cependant, dans certains cas, châtrés du fait de ceux-ci.

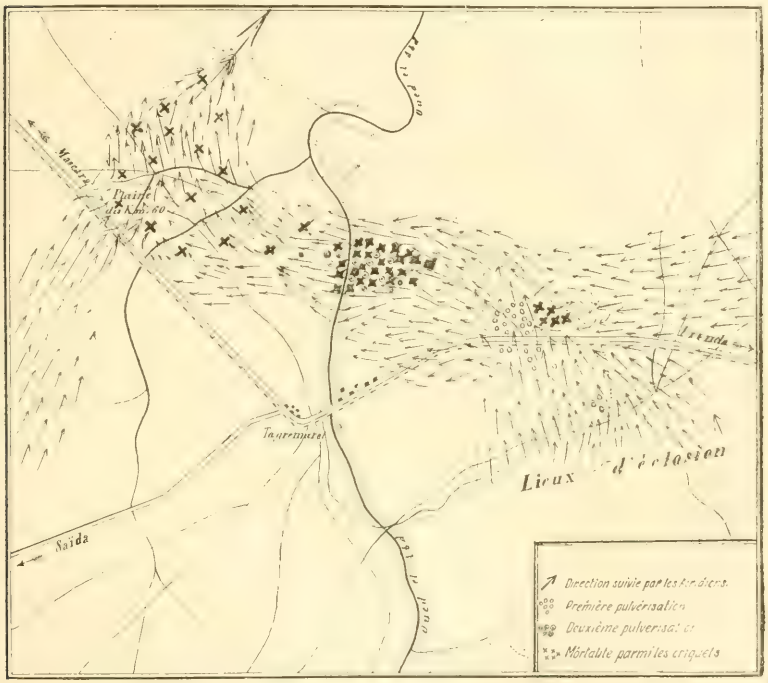
Effet du Coccobacillus acridiorum *sur d'autres insectes.* — Nous n'avons relevé aucun fait, au cours de nos minutieuses recherches sur le terrain, révélant une action quelconque des Coccobacilles sur d'autres insectes que les Stauronotes : les insectes les plus nombreux dans les mêmes régions étaient des Coléoptères et des Fourmis, puis d'autres Orthoptères.

Rapports du Coccobacille avec les autres ennemis des Acridiens. — Nous n'avons rien relevé de saillant dans les rapports que peut présenter l'infection coccobacillaire avec la lutte poursuivie contre les Acridiens par un grand nombre d'autres ennemis : Fourmis et Coléoptères se saisissent des mourants et s'en nourrissent. A ce point de vue, beaucoup d'Acridiens aux premiers stades de leur infection, qui sont simplement ralentis dans leurs mouvements (ils marchent dans ce cas sur leurs deux paires de pattes antérieures, la dernière paire raidie immobile au-dessus du corps), sont plus facilement capturés par leurs ennemis, les Insectes, et sans doute aussi par leurs autres grands ennemis, les Oiseaux (surtout les Passereaux).

Enfin, nous avons observé parfois la présence d'*Idia lunata Fabricius* (Muscide) auprès des gîtes d'Acridiens.

2° Essais en plein champ.

Les essais de contamination des taches de Criquets ont eu lieu dans la plaine de Tagremaret, sur les Hauts-Plateaux Oranais, en avril-juillet 1912. Les jeunes Criquets nés dans des



Échelle au $\frac{1}{125.000}$.

collines pierreuses au sud de cette plaine descendirent vers elle par petites étapes et en petites colonnes. Ils ne gagnaient souvent pas plus de 30 mètres par jour en avril, quelquefois 100 ou 200 mètres, se nourrissant de la végétation spontanée, épargnant les orges, qui ne furent attaquées que par les gros Criquets et les Sauterelles adultes. Ces colonnes ne marchent que par la grosse chaleur et au grand soleil. Elles avançaient d'une façon générale vers le nord, mais changeaient parfois de direction sans cause évidente, et parfois tourbillonnaient.

Lorsque les Criquets furent près de leur dernière mue, la plupart de ces colonnes se réunirent en une seule.

Ce fut une de ces colonnes que nous attaquâmes à deux reprises différentes. Du 15 au 22 avril, nous pulvérisâmes sur elle, sur une superficie de 20 hectares environ, 37 litres de bouillon ensemencé avec du virus des 3e et 7e passages. Les pulvérisations étaient effectuées avec l'appareil Vermorel, après le coucher du soleil, sur les touffes d'herbe (Composées, Carduacées) (1) couvertes par la tête de colonne.

C'est, en effet, à la tête de colonne que les Criquets sont le plus nombreux, tassés au point de cacher complètement la terre et la végétation.

On a chance d'infecter ainsi non seulement les Criquets qui vont passer la nuit sur ce front de bandière, mais tout le reste de la colonne, qui, le lendemain, passera par le même endroit.

Au coucher du soleil, les Criquets se rassemblent en taches opaques, de sorte que les gouttelettes ténues tombaient non seulement sur les herbes, mais sur la masse grouillante des Criquets, sautant verticalement à 20-30 centimètres de hauteur, et pas une goutte de bouillon n'était perdue.

Dès les premiers jours qui suivirent ces pulvérisations, nous recueillîmes dans les champs de rares Criquets malades qui nous montrèrent des Coccobacilles.

C'est le 30 avril que nous vîmes le principal effet des pulvérisations opérées du 15 au 22 avril : des centaines de Criquets morts en tas sous des buissons, à quelques dizaines de mètres des points pulvérisés les plus proches.

Mais l'immense majorité de la colonne avait progressé sans encombre.

(1) A propos des plantes dévorées par les Criquets, nous citerons un fait intéressant au point de vue botanique, et qui peut avoir une certaine importance pratique. Le capitaine Bugnet a bien voulu nous signaler qu'à Djelfa, où il a assisté en 1908 à une invasion de Criquets pèlerins, l'unique arbre qu'ils respectaient était le *Melia azedarach*. Or, nous retrouvons dans *El jardin botanico de Buenos Aires*, par Carlos Thays, p. 173, que *Melia azedarach* peut être considéré comme le seul arbre complètement à l'abri de la morsure des Criquets pèlerins en Argentine. Le *Melia* est justement un des arbres qui s'accommodent le mieux du climat algérien et dont on retrouve de belles plantations, du rivage même de la Méditerranée jusque dans les régions sahariennes.

Une seconde attaque est opérée du 13 au 21 mai avec du virus qui a fait des passages plus nombreux (du 74e au 87e passage), c'est-à-dire plus virulent. 93 litres de culture sont pulvérisés. A ce moment, plusieurs autres colonnes de Criquets se sont jointes à la première et tous sont devenus des Sauterelles adultes.

Les points de pulvérisation sont espacés sur une surface de 40 hectares environ couverte par la colonne.

Les résultats constatés une semaine plus tard (le 28 mai) sont frappants. Sur ces 40 hectares il y a en moyenne 5 morts par mètre carré. Sur le bord d'une rivière (Oued el Abd) à fort courant, qui a dû arrêter quelque temps la marche des Sauterelles, des amas de cadavres remplissent les dépressions et les rigoles.

Mais de l'autre côté de ce ravin cinquante hectares de céréales sont occupés par un vol de Sauterelles qui ne montrent ni malades ni traînards.

On capture au hasard plusieurs de ces Sauterelles d'apparence tout à fait saine, le contenu intestinal de quelques-unes donne en culture pure le *Coccobacillus acridiorum*.

III

PROPAGATION NATURELLE DE L'ÉPIZOOTIE

A partir de ce moment, nous nous bornâmes à observer, sans pratiquer de nouvelles pulvérisations. Il était, en effet, intéressant de savoir ce que deviendrait cette tache de Sauterelles qui contenait des porteurs de germes. D'autant plus que, le 5 juin, nous assistâmes à l'arrivée d'un vol de Sauterelles provenant de la commune mixte de Saïda, où aucune pulvérisation n'avait été faite, et qui rejoignit la colonne en expériences dans la plaine dite du kilomètre 60.

Ce vol de Sauterelles fut observé de près pendant plus de trois semaines, jusqu'au 1er juillet. Il s'envolait chaque matin pour se poser chaque soir, allant et venant, sans direction générale, tourbillonnant et reculant les jours de vent. Il disparut enfin vers le N.-N.-E. le 1er juillet, sans qu'on pût le suivre.

Chaque matin, on trouvait, sur les emplacements où le vol

avait passé la nuit, des cadavres de Sauterelles. Ces cadavres étaient surtout nombreux sous les buissons (Jujubier sauvage, *Zizyphus lotus* L.) où parfois on pouvait les compter groupées par centaines.

Malgré ces morts, le nombre des Sauterelles ne paraissait pas diminué. Il est évident que la contagion ne s'est pas étendue à la majorité des Sauterelles, ou bien que beaucoup avaient une immunité naturelle, ou bien qu'elles acquéraient facilement une immunité active et toléraient le parasitisme du *Coccobacillus acridiorum*.

IV

CONCLUSIONS

I. — De ce premier essai, il résulte qu'on peut arriver à exalter la virulence du *Coccobacillus acridiorum* d'Hérelle vis-à-vis du Stauronote marocain, de façon à tuer régulièrement celui-ci en 4 heures en moyenne.

II. — On a pu infecter des taches de Stauronotes en pulvérisant sur leurs gîtes nocturnes des cultures microbiennes; une forte mortalité suivit ces pulvérisations, après quelques jours d'incubation.

III. — La propagation de l'épizootie aux autres taches qui venaient se fusionner avec celle qui comptait des morts et des porteurs de germes ne s'est effectuée qu'à un faible degré, dans cette courte expérience.

Les résultats constatés indiquent donc qu'il reste des questions à résoudre et qu'il est nécessaire de reprendre l'an prochain l'expérience sur une plus grande échelle. Nous possédons actuellement un virus habitué au Stauronote et très virulent pour lui.

On est en droit d'espérer qu'au printemps prochain quelques passages par Criquets suffiront à lui rendre sa virulence actuelle que la vie hivernale *in vitro* aura sans doute atténuée.

Avec ce virus très virulent d'emblée, il faudra tenter de

créer une épizootie dans plusieurs taches de Criquets, et, pour essayer de rendre cette épizootie le plus contagieuse possible, il faudra étudier spécialement les points suivants :

Quels sont les modes naturels de la contamination des Acridiens entre eux par le Coccobacille : l'ingestion de cadavres ? l'ingestion des pâtures souillées par les déjections des malades (diarrhée jaune ou noirâtre) ?

Etant données les maigres cultures et la végétation clairsemée de leurs lieux habituels de ponte en Algérie, ont-ils plus de chance d'échapper à la contamination par ingestion de pâtures souillées par les déjections de leurs congénères infectés ?

Les Stauronotes sont-ils moins cannibales que les *Schistocerca ?* Et par suite sont-ils moins exposés que ceux-ci à s'infecter par ingestion de cadavres infectés ?

Y a-t-il d'autres conditions, propres au milieu algérien, qui gênent ou favorisent la propagation de l'épizootie ?

Peut-on trouver d'autres moyens que les modes naturels d'inter-contamination pour propager l'épizootie ?

Se produit-il une castration parasitaire des femelles porteuses de germes ?

En admettant que l'on n'observe pas, en Algérie, les faits de diffusion rapide de l'épizootie, signalés par d'Hérelle en Argentine, y a-t-il un intérêt économique à utiliser le *Coccobacillus acridiorum* contre les Sauterelles algériennes, soit seul, soit associé aux autres modes connus de destruction des Acridiens ?

Voilà quelques-unes des nombreuses questions auxquelles seule une expérimentation bien surveillée et poursuivie pendant plusieurs années pourra répondre.

En terminant cette Note, nous sommes heureux de remercier cordialement de leur collaboration M. l'administrateur Tondu, de Frenda; M. l'administrateur-adjoint Ivara, et MM. Porthé, du Syndicat de défense contre les Sauterelles de Frenda. Nous remercions vivement le Dr F. d'Hérelle de ses bons avis, et notre fidèle collaborateur Louis Landes de son aide dévouée.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR UNE MÉTHODE THÉRAPEUTIQUE BASÉE SUR LA STIMULATION DES PHAGOCYTES

par T. YAMANOUCHI.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Metchnikoff, par ses expériences sur la digestion intracellulaire et sur le rôle des cellules amiboïdes du mésoderme, qu'il a nommées phagocytes, nous a donné la clé de certains phénomènes biologiques.

Les macrophages, cellules amiboïdes mononucléées, sont les seuls phagocytes des animaux inférieurs. Chez les animaux supérieurs, ils concourent à la résorption des organes voués à l'atrophie (queue du têtard), ainsi qu'à la destruction des cellules affaiblies ou séniles ; exceptionnellement aussi, ils entrent en jeu dans la lutte contre les microbes (maladies chroniques). Les leucocytes polynucléés ou microphages existent chez les animaux supérieurs. Ils transportent les matériaux de l'assimilation et de la désassimilation ; en outre, ils défendent l'organisme contre les poisons, les venins, les toxines et les microbes.

Les phagocytes jouent ainsi à tous les instants de la vie normale et pathologique un rôle capital. On peut résumer en quelques lignes les conclusions de M. Metchnikoff dans sa conférence Nobel, à Stockholm, le 14 mai 1909 : « Tout ce qui est capable de fortifier les phagocytes et de stimuler leur activité augmente en même temps la résistance de l'organisme contre les maladies infectieuses. L'état d'immunité est caractérisé par l'intensité du processus phagocytaire : lorsque la maladie est déclarée, une phagocytose très active est d'un bon pronostic, car elle conduit à la guérison en favorisant la destruction et l'élimination des substances nocives d'origine

pathologique..... Ces constatations, termine Metchnikoff, permettent d'espérer la découverte prochaine d'une nouvelle méthode prophylactique et thérapeutique contre les maladies infectieuses, méthode qui serait basée sur le renforcement de la phagocytose (1). »

Deux facteurs sont à considérer : l'augmentation du nombre des leucocytes et l'augmentation de leur activité phagocytaire.

L'hyperleucocytose existe dans les cas de suppuration aboutissant à la guérison ; elle existe également chez les animaux traités par le séton et c'est à elle qu'il faut attribuer chez l'homme les guérisons autrefois obtenues par l'action du séton ou du cautère.

On provoque artificiellement l'hyperleucocytose en injectant sous la peau ou dans le sang des solutions isotoniques de nucléinate de soude ou d'argent colloïdal.

Depuis longtemps on a employé la levure de bière à l'intérieur dans le traitement de certaines infections, notamment la furonculose. Doyen, en 1899, isola le principe actif de la levure de bière, sous la forme d'une substance albuminoïde soluble et dénuée de toute action sur les solutions sucrées. Il a présenté cette préparation à l'Académie de Médecine, le 13 février 1900, sous la forme de paillettes jaunâtres, très hygrométriques et altérables par la chaleur au-dessus de 50 degrés.

Il prépara ensuite une solution injectable qu'il expérimenta chez l'homme, contre l'infection staphylococcique ; ses premiers résultats thérapeutiques ont été communiqués à l'Académie de Médecine, le 29 juillet 1902 (2).

Son liquide injectable, improprement nommé par Doyen sérum antistaphylococcique, a été employé à partir du mois de janvier 1903, dans les hôpitaux de Paris, par les Drs Toupet, Moutard-Martin et Labadie-Lagrave. Cette préparation, très riche en glycérine salycilée, était impropre à l'expérimentation sur les animaux.

En 1903, M. Ed. Sergent a expérimenté, avec succès, sur les lapins infectés avec le staphylocoque, l'extrait aqueux de levure de bière, en injections sous-cutanées (3).

(1) Kolle et Wassermann, *Hand. d. path. Mikro.*, 2e vol., 1re partie, p. 729.
(2) *Revue critique de médecine et de chirurgie*, 31 juillet 1902, p. 80.
(3) *Annales de l'Institut Pasteur*, octobre 1903, p. 634.

Doyen a modifié en 1905 ses premières préparations, qui étaient obtenues à froid. Les nouvelles préparations qu'il préconise depuis cette époque (1) supportent la stérilisation par la chaleur. Il leur a donné le nom de « Mycolysine ». La mycolysine s'emploie sous deux formes : solution buvable et solution injectable ; ces préparations agissent, d'après Doyen, en stimulant à la fois la leucocytose et la phagocytose. L'organisme, sous leur influence, devient résistant à un certain nombre de microbes ; la mycolysine, selon Doyen, agit préventivement dès que l'infection est menaçante ; elle agit également contre la maladie déclarée et, dans ce cas, son activité est d'autant plus rapide qu'elle est employée plus près du début de l'infection.

La substance active de la mycolysine injectable est une matière azotée d'origine végétale, que l'analyse chimique y décèle dans la proportion d'environ 6 p. 100.

Ayant observé les effets thérapeutiques de la mycolysine chez l'homme, dans un certain nombre de maladies infectieuses : staphylococcie, streptococcie, pneumococcie, gangrène gazeuse, infection par le bactérium coli, j'ai cru intéressant d'étudier sur l'homme et sur les animaux de laboratoire le mode d'action de cet agent thérapeutique. J'ai comparé les effets de la mycolysine à ceux du nucléinate de soude et de l'argent colloïdal.

J'ai employé, pour plus de précision, la méthode hypodermique. Les doses de mycolysine injectable ont varié chez l'homme de 10 à 50 cent. cubes. Chez les animaux de laboratoire, je l'ai injectée à la dose de 1 à 2 cent. cubes par kilogramme de poids vif.

On peut répéter les injections chaque jour, pendant plusieurs jours de suite et sans inconvénient. Le liquide se résorbe très vite après l'injection sous-cutanée. Chez les animaux, j'ai fait des injections sous-cutanées, intrapéritonéales et intraveineuses. Je n'ai pas observé d'accidents.

J'ai étudié l'action de la mycolysine sur la leucocytose et sur la phagocytose, chez l'homme et chez les animaux, dans l'état

(1) Congrès international de Lisbonne, avril 1906, et *Revue critique de médecine et de chirurgie*, mai 1906, p. 53.

normal et dans l'état pathologique. J'ai ensuite comparé à l'action de la mycolysine, chez le lapin, l'action du nucléinate de soude et de l'argent colloïdal. L'action de la pamphagine, préparation vétérinaire, est identique à celle de la mycolysine.

Cette préparation a été expérimentée en 1910 sur les maladies infectieuses des animaux domestiques (1).

Leucocytose. — La numération des leucocytes a été faite avant l'injection immunisante et elle a été répétée ensuite à plusieurs reprises. Le coefficient de la leucocytose a été établi :

A. Par rapport au chiffre primitif (ce chiffre était très élevé dans plusieurs cas pathologiques) ;

B. Par rapport au chiffre normal (7.000 leucocytes par millimètre cube).

Phagocytose. — Le coefficient de la phagocytose a été déterminé *in vitro* après mélange des leucocytes et des microbes, soit avec de l'eau salée isotonique, soit avec des dilutions titrées de mycolysine, de nucléinate de soude et d'argent colloïdal dans l'eau salée isotonique.

Hyperphagocytose. — Le produit du coefficient de la *Leucocytose* par celui de la *Phagocytose* donne le coefficient de l'*Hyperphagocytose* : supposons que les leucocytes se soient élevés du chiffre normal 7.000 à 21.000 (coefficient 3) et que pour 100 leucocytes le chiffre des microbes phagocytés se soit élevé de 260 (expérience de contrôle) à 520 (coefficient 2), le coefficient de l'*Hyperphagocytose* sera de $3 \times 2 = 6$.

Après avoir vérifié l'action stimulante de la mycolysine sur les leucocytes et sur les phagocytes, j'ai étudié son action préventive et son action curative dans un certain nombre d'infections expérimentales.

J'ai recherché enfin si la mycolysine agissait sur les phagocytes seuls, ou bien si elle exerçait une action directe sur les microbes.

(1) *Archives de Doyen*, n° 2, 15 décembre 1910, p. 104, et numéros suivants.

I. Action de la mycolysine sur les leucocytes chez l'homme.

J'ai étudié l'action de la mycolysine sur les leucocytes, chez l'homme, dans un grand nombre de cas.

Je citerai 16 de ces observations, où la numération des leucocytes a été faite plusieurs fois par jour.

Ces cas ont été divisés en 3 séries, suivant qu'il y avait, avant l'injection de mycolysine :

1° Hypoleucocytose (au-dessous de 7.000 leucocytes) ;

2° Leucocytose à peu près normale (de 7.000 à 10.000 leucocytes) ;

3° Hyperleucocytose (au-dessus de 10.000 leucocytes).

1° Deux malades étaient atteints d'hypoleucocytose ; il s'agissait de vieillards cachectiques et atteints de cancer. Le premier avait 4.800 et le second 6.000 leucocytes.

2° Chez 6 malades, la leucocytose était à peu près normale.

3° Chez 8 malades, il y avait hyperleucocytose d'origine inflammatoire.

Chez les deux premiers malades, qui étaient très affaiblis, le coefficient leucocytaire s'est élevé sous l'influence de la mycolysine, par rapport au chiffre primitif, à 1,33 et à 1,4.

Chez les sujets dont l'hyperleucocytose était à peu près normale, le coefficient leucocytaire s'est élevé, sous l'influence de la mycolysine, dans les proportions suivantes :

	COEFFICIENT A par rapport au chiffre primitif	COEFFICIENT B par rapport au chiffre normal (7.000 par mm³.)
Jeune femme atteinte de cancer de l'ovaire.	4,6	4,7
Homme de 80 ans atteint d'épithéliome . . .	1,3	1,4
Sténose fibreuse du pylore, chez un homme.	2,5	3,14
Malade atteint de lipome	2,»	2,6
Mal perforant plantaire	2,8	3,6
Cancer du rectum	2,1	2,85

Chez les malades déjà atteints d'hyperleucocytose d'origine inflammatoire, j'ai obtenu les chiffres suivants :

	COEFFICIENT A	COEFFICIENT B
	—	—
Pharyngite chronique	1,36	2,5
Suppuration intestinale	1,4	2,12
Cancer de la langue et du maxillaire	1,86	3,2
Cancer de la lèvre supérieure et du maxillaire	1,5	2,6
Cancer de la lèvre inférieure et du maxillaire	1,2	2,12
Ganglions cancéreux suppurés du cou	1,33	2,16
Abcès de l'aisselle	1,3	2,86
Appendicite chez une enfant de dix ans	3,1	7, »

L'ensemble de ces observations démontre que l'hyperleucocytose produite par la mycolysine a été très accentuée chez les sujets jeunes et résistants et qu'au contraire, elle a été très peu élevée chez les sujets très âgés, cachectiques, particulièrement chez les vieillards cancéreux et affaiblis.

II. — Action de la mycolysine, du nucléinate de soude et de l'argent colloïdal chez le lapin normal.

1° *Evaluation de la leucocytose et du coefficient phagocytaire après l'injection intraveineuse de mycolysine de 2 à 3 cent. cubes suivant le poids.* — J'ai choisi le *bacterium coli*, parce que ce microbe est toujours en éléments isolés ; sa numération est ainsi plus précise que celle des microcoques, qui se trouvent souvent agglomérés en groupes de plusieurs unités.

Les leucocytes ont été prélevés après centrifugation du sang défibriné et sans avoir subi de lavage. Ils étaient donc en suspension dans le sérum sanguin.

Les microbes phagocytés ont été comptés dans 100 leucocytes. Le nombre des hématies, d'environ 4.500.000, n'a pas varié sensiblement d'une numération à l'autre.

Exp. I. — *Hyperleucocytose produite par l'injection de mycolysine.*

Chez les quatre premiers lapins, dont la leucocytose était normale, le coefficient de l'hyperleucocytose produite par la mycolysine a été respectivement de 2, de 3, de 2,9, et de 3,2 ; le coefficient de phagocytose a été, pour les mêmes lapins et dans le même ordre, de 6,5, de 3,5, de 1,75 et de 2,6, ce qui donne, si l'on multiplie le coefficient de l'hyperleucocytose par le coefficient de la phagocytose, le coefficient de l'hyperrésistance.

Ce coefficient a été :

Pour le premier lapin, de.	2 × 6,5	=	13 »
Pour le second lapin, de.	3 × 3,5	=	10,5
Pour le troisième lapin, de	2,9 × 1,75	=	5,1
Pour le quatrième lapin, de	3,2 × 2,6	=	8,3

Soit une moyenne :

Pour l'hyperleucocytose, de.	2,77
Pour la phagocytose, de.	3,58
Pour l'hyperrésistance, de..	9,91

Exp. II. — *Recherche du titre optimum du mélange de mycolysine injectable et d'eau salée pour la phagocytose,* in vitro, *par les leucocytes du sang de lapin.*

L'expérience a été faite avec le bactérium coli. J'ai compté, au bout de 10 minutes de séjour à l'étuve, les microbes contenus dans 100 leucocytes.

Cette expérience a été répétée 5 fois. Ces 5 expériences différentes ont démontré que le titre optimum du mélange de mycolysine injectable et d'eau salée, pour favoriser la phagocytose, était de 1 p. 600. J'ai pris pour unité des expériences de contrôle, faites en présence de l'eau salée isotonique.

Le chiffre ainsi obtenu étant pris pour unité, le coefficient phagocytaire maximum de la mycolysine, à la dilution de 1 p. 600, a été ainsi varié :

Première expérience.	2,16
Seconde expérience.	1,75
Troisième expérience	2,29
Quatrième expérience.	2,34
Cinquième expérience.	2,48

Soit une moyenne de 2,2.

Exp. III. — *Influence des dilutions* : 1° *de mycolysine*; 2° *d'argent colloïdal*; 3° *de nucléinate de soude*; *et* 4° *de bouillon peptonisé, sur la phagocytose.*

A. — Des expériences analogues à la précédente ont été faites comparativement avec la mycolysine, avec l'argent colloïdal ou électrargol, avec le nucléinate de soude et avec le bouillon peptonisé.

Tandis que la dilution optima de mycolysine pour stimuler la phagocytose est demeurée de 1 p. 600, la dilution la plus favorable pour l'électrargol, pour le nucléinate de soude et pour le bouillon peptonisé a varié de 1 p. 50 à 1 p. 100.

D'autre part, tandis que le coefficient phagocytaire maximum de mycolysine à la dilution de 1/600 a été de 2,34 dans une expérience et de 2,48 dans une autre, soit une moyenne de 2,41, le coefficient phagocytaire maximum pour l'électrargol a été, dans une expérience, de 1,64, à la dilution de 1/50, et dans une autre expérience, de 1,5 à la dilution de 1 p. 100, soit une moyenne de 1,57.

Pour le nucléinate de soude le même coefficient a été, dans une expérience, de 1,36, à la dilution de 1/50, et dans une seconde expérience, de 1,45, à la dilution de 1 p. 100, soit une moyenne de 1,4.

Enfin, pour le bouillon peptonisé, il a été de 1,33, à la dilution de 1/50.

B. — En présence de ces chiffres, il était intéressant de rechercher si l'électrargol et le nucléinate de soude produisaient chez le lapin, après une

injection intraveineuse aboutissant au même degré de leucocytose, une hyperphagocytose équivalente à celle que produit la mycolysine.

J'ai choisi 3 lapins chez lesquels l'injection de mycolysine pour le premier, d'électrargol pour le second, et de nucléinate de soude pour le troisième, avait produit une leucocytose identique.

Le chiffre de la leucocytose était, 5 heures après l'injection :

Chez le premier lapin, de.	28,800
Chez le deuxième lapin, de.	27,000
Chez le troisième lapin, de.	27,600

Le coefficient phagocytaire a été déterminé : d'abord avant l'injection produisant l'hyperleucocytose, puis 5 heures après, au moment où l'hyperleucocytose avait atteint le chiffre indiqué. Ce coefficient phagocytaire a été :

Pour le premier lapin, traité par la mycolysine, de. . .	4,1
Pour le second lapin, traité par l'électrargol, de. . . .	1,15
Pour le troisième lapin, traité par le nucléinate de soude, de.	2,5

III. — Action de la mycolysine injectable contre l'infection par le staphylocoque et par le streptocoque chez le lapin, par le pneumocoque chez le rat blanc.

1° — Infection par le staphylocoque.

Culture virulente pour le lapin, provenant de l'Institut Pasteur.

Injection de 5 cent. cubes d'une culture sur bouillon, datant de 24 heures, sous la peau du ventre.

A. — *Injection préventive intraveineuse de 2 cent. cubes de mycolysine quelques minutes avant l'injection sous-cutanée de staphylocoques.* — Cette expérience a été répétée sur 14 lapins : 7 témoins et 7 traités. Tous les témoins ont présenté une inflammation purulente sous-cutanée très étendue et la plupart ont succombé à la septicémie staphylococcique.

Au contraire, chez 13 des animaux traités, on n'a observé aucune trace d'inflammation ni de suppuration ; un seul lapin présenta un petit abcès localisé sans gravité, gros comme une noisette.

B. — *Action curative de la mycolysine injectable contre l'infection staphylococcique chez le lapin.* — Cette expérience a été répétée sur 16 lapins, 8 témoins et 8 traités. Tous ces lapins ont reçu sous la peau du ventre une injection sous-cutanée viru-

lente d'une culture de staphylocoques dorés de 24 heures, sur bouillon.

Au bout de 7 à 8 heures, tous présentaient une inflammation diffuse et de la rougeur. L'abcès a évolué chez tous les témoins.

Chez 7 des lapins traités, l'infiltration et l'inflammation ont été suivies d'une résolution complète, 24 heures après l'injection de mycolysine. Chez le 8e, l'inflammation a disparu le premier jour et l'induration, qui était un peu plus étendue que chez les autres, s'est résolue en quelques jours.

C. — *Action comparative de la mycolysine, de l'électrargol et du nucléinate de soude contre l'infection staphylococcique.*

Exp. I. 8 lapins. — *Injection préventive intraveineuse de mycolysine de 2 cent. cubes immédiatement avant l'injection de 1 cent. cube de la culture de staphylocoques sous la peau du ventre.*

Mycolysine. 2 lapins. — Les microbes injectés disparaissent sans la moindre apparence d'inflammation locale.

Electrargol. 2 lapins. — Infiltration œdémateuse et inflammation. L'abcès évolue comme chez les témoins.

Nucléinate de soude. 2 lapins. — Infiltration œdémateuse et inflammation. L'abcès évolue comme chez les témoins.

Témoins. 2 lapins. — Infiltration œdémateuse et grand abcès.

Exp. II. — *Evaluation numérique de la leucocytose et de la phagocytose (8 lapins).*

La leucocytose et la phagocytose ont été déterminées avant l'expérience chez les 8 lapins. Elles ont été ensuite déterminées, chez les 6 lapins traités, 5 heures après l'injection immunisante. Immédiatement après cette seconde numération, les 6 lapins traités et les deux témoins ont reçu l'injection de staphylocoques sous la peau du ventre. Les injections immunisantes ont été répétées le lendemain et le surlendemain chez les 6 animaux traités. La leucocytose et la phagocytose ont été déterminées chez les 8 animaux pendant les 3 jours qui ont suivi l'injection de staphylocoques.

Dans cette expérience, on a constaté, comme dans les expériences précédentes, que l'hyperleucocytose produite par la mycolysine a été supérieure à celle produite par l'électrargol et par le nucléinate de soude.

Il en a été de même pour la phagocytose *in vitro*, 5 heures après l'injection intraveineuse de ces agents thérapeutiques. L'écart en faveur de la mycolysine a atteint le maximum 24 heures après l'injection de la culture virulente de staphylocoques.

L'analyse de cette expérience démontre que sur le lapin normal :

1° Les coefficients de la leucocytose et de la phagocytose sont plus élevés après les injections de mycolysine qu'après les injections d'électrargol ou de nucléinate de soude ;

2° Lorsque le lapin est infecté par le staphylocoque, la réaction défensive produite par la mycolysine augmente dans des proportions considérables : elle a atteint, pour la leucocytose, le chiffre de 14 par rapport aux chiffres de 3,8 pour l'électrargol et de 2,7 pour le nucléinate de soude ; pour la phagocytose, elle a atteint le chiffre de 2,8 par rapport aux chiffres de 1,58 pour l'électrargol et de 1,53 pour le nucléinate de soude.

Ce qui donne, en multipliant les deux coefficients, leucocytose et phagocytose, le coefficient de l'hyperphagocytose, qui a été de 39,2 pour la mycolysine, de 6 pour l'électrargol et de 3,2 pour le nucléinate de soude.

La réaction défensive produite par la mycolysine augmente dès que l'infection se produit et elle la jugule. Immédiatement après, la leucocytose et la phagocytose diminuent et elles se rapprochent de la normale.

Au contraire, l'hyperleucocytose provoquée par l'électrargol et par le nucléinate de soude n'a pas suffi pour empêcher la formation de l'abcès, qui a évolué malgré la persistance de cette leucocytose.

Exp. III. — *Action préventive de l'injection intraveineuse de mycolysine contre l'injection intraveineuse de staphylocoques.* 2 lapins. — Un de ces lapins reçoit 2 cent. cubes de mycolysine dans les veines. 5 heures après, les 2 lapins reçoivent une injection intraveineuse de 5 cent. cubes d'une suspension de staphylocoques, contenant environ 50 millions de cocci.

La recherche des cocci dans le sang, 15 minutes après l'injection, ne permet d'en déceler qu'un petit nombre, les uns libres dans le plasma, les autres déjà presque complètement digérés par les microphages.

Or, le volume du sang d'un lapin de 2 kilogrammes étant d'environ 110 cent. cubes, chaque millimètre cube du sang examiné aurait dû contenir environ 500 cocci.

D'autres expériences seront faites pour démontrer le mode de disparition si rapide des staphylocoques injectés.

Le lapin *témoin* est mort au bout de 24 heures.

Le lapin *traité préventivement* n'a présenté aucun malaise.

2°. — Action préventive de la mycolysine contre l'infection streptococcique chez le lapin.

Première expérience. — Injection préventive de mycolysine 24 heures avant l'inoculation (2 lapins).

1 lapin *témoin*. Erysipèle : mort. — 1 lapin traité. Aucune lésion. Sur l'observation que la culture pourrait n'être pas assez virulente, l'expérience a été répétée en inoculant 2 ou 3 gouttes d'une culture ultra-virulente.

Deuxième expérience (2 lapins). — 1 lapin *témoin*. Erysipèle : mort. — 1 lapin traité. Erysipèle : mort.

Troisième expérience (6 lapins). — 3 lapins *témoins*. Erysipèle : morts. — 3 lapins traités. Erysipèle : morts.

La virulence de la culture a été vérifiée sur trois autres animaux. Ces 3 lapins, qui avaient déjà servi à d'autres expériences, sont morts au bout de 24 heures, tandis que les lapins neufs résistaient davantage et succombaient généralement au bout de 4 jours.

Quatrième expérience (8 lapins). — Une seule injection préventive étant insuffisante, j'ai injecté chaque jour à 4 lapins, pendant 4 jours consécutifs, 2 cent. cubes de mycolysine dans les veines. Le 4e jour, ces 4 lapins traités et 4 témoins ont reçu la même culture sur bouillon, sous la peau de l'oreille.

4 témoins : morts au bout de 4 jours. — 4 traités : 1 mort au bout de 4 jours ; 3 n'ont présenté aucune lésion.

Cette expérience prouve que les injections préventives de mycolysine, répétées pendant plusieurs jours, élèvent progressivement le potentiel vital du lapin et le rendent plus résistant au streptocoque qu'une seule injection préventive de la même préparation.

3°. — Action préventive de la mycolysine contre l'infection pneumococcique chez le rat blanc.

Première expérience. — 4 rats blancs.

Injection d'une culture de pneumocoques dans le péritoine. 2 rats reçoivent en même temps sous la peau 1 cent. cube de mycolysine.

2 témoins : morts en 24 heures. — 2 traités : morts avec un retard de 12 et de 24 heures.

Deuxième expérience. — 4 rats blancs.

Injection préventive de mycolysine (1 cent. cube) sous la peau. Le lendemain, nouvelle injection de mycolysine et injection intrapéritonéale de pneumocoques.

2 témoins : morts en 24 heures. — 2 traités : 1 mort, 1 *survit.*

Troisième expérience. — 6 rats blancs. Même expérience :

3 témoins : morts en 24 heures. — 3 traités : 1 mort, 2 *survivent.*

Soit, sur 10 rats, dont 5 témoins, 100 p. 100 de mortalité chez les témoins et 40 p. 100 de mortalité chez les traités.

IV. — Etude du processus de l'immunisation par la mycolysine.

La mycolysine agit-elle sur les *leucocytes* seuls, comme une *stimuline*, ou bien agit-elle aussi sur les microbes, à la manière d'une *sensibilisatrice*?

A. — *Action de la mycolysine sur les leucocytes et sur l'index opsonique du sérum du lapin.* — Sur 6 lapins, 2 ont reçu des injections sous-cutanées de mycolysine pendant 3 jours, et je leur ai fait le 4e jour une injection intraveineuse de 2 cent. cubes.

2 ont reçu le dernier jour une seule injection intraveineuse de 2 cent. cubes.

Les 2 derniers étaient des lapins témoins.

Première expérience. — 2 heures après la dernière injection de mycolysine, un des lapins de chaque série a été saigné. Les leucocytes de ces lapins ont été séparés et lavés à l'eau salée isotonique et leur pouvoir phagocytaire a été mesuré en présence du sérum d'un lapin normal.

Pour le lapin de la 2e série (une seule injection de mycolysine) le coefficient phagocytaire a été de 1,35.

Pour le lapin de la 1re série (4 injections de mycolysine) le coefficient phagocytaire a été de 1,87, l'unité étant la phagocytose chez le lapin normal.

Cette expérience montre que les injections de mycolysine augmentent sensiblement l'activité phagocytaire des leucocytes...

Deuxième expérience. — Après avoir constaté l'hyperactivité phagocytaire des leucocytes des lapins soumis aux injections de mycolysine, comparativement à l'activité phagocytaire des leucocytes du lapin témoin, j'ai déterminé *l'index opsonique* du sérum de deux lapins préparés de la même manière, en présence des leucocytes d'un lapin normal.

Les prélèvements de sérum chez les lapins des deux premières séries ont été faits, une première fois, deux heures après, et une seconde fois, cinq heures après la dernière injection de mycolysine. On a prélevé pour le contrôle le sérum d'un lapin témoin de la troisième série.

L'index opsonique des sérums des lapins de l'expérience a été déterminé :

1° à l'état frais, en prenant comme base le sérum normal d'un lapin témoin ;

2° après chauffage à 56 degrés.

Cette expérience a démontré que :

1° Le chauffage à 56 degrés pendant trente minutes détruit le pouvoir opsonique du sérum aussi bien chez le lapin témoin et normal que chez les lapins ayant reçu des injections de mycolysine ;

2° L'index opsonique du sérum du lapin préparé par la mycolysine est supérieur à celui du sérum du lapin témoin.

Les chiffres obtenus chez le témoin étaient pris comme unité, l'index opsonique a été : pour le lapin de la seconde série (une seule injection de mycolysine), deux heures après l'injection, 1,34, et cinq heures après, 1,11 ; pour le lapin de la première série, qui avait reçu quatre injections de mycolysine : deux heures après la dernière injection, 1,63, et cinq heures après, 1,26.

V. — La mycolysine n'exerce aucune action directe sur les microbes.

Première expérience. — Culture de staphylocoques de 24 heures, sur gélose inclinée, et en suspension dans 20 cent. cubes d'eau salée isotonique. 10 cent. cubes de cette solution sont centrifugés, les microbes sont mis en suspension dans 10 cent. cubes d'une solution de mycolysine à 1/100 et je

les laisse pendant trente minutes à l'étuve, à la température de 38 degrés.

L'émulsion est alors centrifugée et lavée à l'eau salée à trois reprises.

Plusieurs expériences comparatives avec le staphylocoque et le *Bacterium coli* ont démontré que la phagocytose était identique avant ou après le contact prolongé des microbes avec la mycolysine.

Dans une autre expérience, j'ai recherché si la mycolysine, à des dilutions variant de 1/10 à 1/500, avait le pouvoir d'agglutiner des cultures de staphylocoques, de *Bacterium coli* et de bacilles typhiques. Je n'ai constaté aucune trace d'agglutination de ces microbes.

Quatrième expérience. — Culture des microbes dans la mycolysine à diverses dilutions.

Plusieurs espèces microbiennes, notamment le staphylocoque et le *Bacterium coli*, ont été ensemencées dans la mycolysine injectable à des dilutions variant de 1/10 à 1/500.

Ces microbes se développent dans la mycolysine, même en solution concentrée.

L'action stimulante de la mycolysine sur les leucocytes étant démontrée par toute la série des expériences qui précèdent, j'ai étudié son effet comparativement sur les leucocytes du sang de lapin normal et sur les leucocytes provenant du pus d'un abcès staphylococcique.

Les leucocytes du pus ont été d'abord examinés à l'éclairage parabolique et à la lumière solaire; j'ai constaté que tous ou presque tous présentaient des mouvements actifs et qu'ils étaient vivants.

Ces leucocytes, lavés à l'eau salée isotonique, se sont montrés incapables d'*englober* le moindre staphylocoque aussi bien en présence de l'eau salée qu'en présence de la mycolysine diluée à 1/600, qui favorise au contraire puissamment la digestion des microbes par les leucocytes du sang.

Conclusions.

1° La mycolysine injectable augmente chez l'homme la leucocytose et la phagocytose. La leucocytose se produit dès les

premières heures qui suivent l'injection et elle dure de vingt-quatre heures à quatre ou cinq jours. Elle est plus durable lorsqu'on injecte sous la peau 50 cent. cubes que lorsqu'on injecte 20 cent. cubes ou 10 cent. cubes.

La leucocytose est moins prononcée chez les sujets *très âgés et cachectiques* que chez les sujets dans la force de l'âge et chez les enfants.

Le coefficient leucocytaire, par rapport à l'unité leucocytaire de 7.000 par millimètre cube, a varié, sur 16 malades traités par la mycolysine, de 1,4 à 7.

Ce même coefficient, par rapport à la numération des leucocytes avant l'injection de mycolysine, a varié de 1,2 à 4,6, un certain nombre des malades examinés présentant déjà de l'*hyperleucocytose pathologique*.

2° *Chez le lapin normal*, la mycolysine exerce la même action stimulante sur la leucocytose et sur la phagocytose.

La moyenne de l'évaluation numérique de la leucocytose, d'une part, et de la phagocytose, d'autre part, donne les coefficients de 2,77 pour la leucocytose et de 3,58 pour la phagocytose, soit, pour le coefficient moyen de l'hyperphagocytose : $2,77 \times 3,58 = 9,91$.

3° La mycolysine injectable à la dilution de 1/600 dans l'eau salée isotonique exerce *in vitro* l'action stimulante maxima sur les leucocytes du lapin.

Le coefficient phagocytaire moyen a été, sur cinq expériences, de 2,2 (minimum 1,75, maximum 2,48) par rapport à l'unité (*contrôle en présence de l'eau salée isotonique*).

4° L'évaluation numérique de la phagocytose des leucocytes du lapin, en présence de solutions injectables normales de mycolysine, d'électrargol, de nucléinate de soude et aussi de bouillon peptonisé, à des dilutions de 1/50 à 1/700, a donné le coefficient maximum, 2,41, pour la mycolysine, à la dilution de 1/600.

Les dilutions d'électrargol, de nucléinate de soude et de bouillon peptonisé ont donné les coefficients respectifs de 1,57 — 1,4 — 1,33, à une dilution de 1/50 à 1/100 (moyenne de 2 expériences).

5° Pour une même hyperleucocytose de 28.000 environ, observée cinq heures après des injections de mycolysine, d'électrargol et de nucléinate de soude, le coefficient phagocytaire a été :

Pour la mycolysine, de	4,1
Pour l'électrargol, de	1,43
Pour le nucléinate de soude, de	2,3

6° L'injection préventive de mycolysine (2 cent. cubes dans les veines) prévient chez le lapin l'infection staphylococcique produite par l'injection sous-cutanée, au ventre, de 1 à 5 cent. cubes de culture virulente sur bouillon.

L'action préventive est augmentée si le lapin est préparé pendant plusieurs jours.

7° L'injection de *mycolysine* provoque la résolution de l'abcès staphylococcique, si on fait l'injection intra-veineuse de la septième à la neuvième heure après l'injection des microbes, c'est-à-dire au moment précis où l'infiltration inflammatoire commence à se manifester ;

8° L'injection préventive d'*électrargol* ou de *nucléinate de soude* n'empêche pas l'infection staphylococcique ; au contraire, des lapins de la même expérience, qui ont reçu préventivement la *mycolysine*, n'ont présenté aucune lésion ;

9° La même expérience, répétée avec évaluation numérique de la leucocytose, de la phagocytose, montre que :

a) Les coefficients de leucocytose et de phagocytose les plus élevés sont obtenus avec la mycolysine :

	LEUCOCYTOSE		PHAGOCYTOSE		COEFFICIENT de l'hyperphagocytose.
	—		—		—
Mycolysine	14 »	×	2,8	=	39,2
Électrargol	3,8	×	1,88	=	6 »
Nucléinate de soude	2,7	×	1,53	=	3,2

b) La courbe montre que la réaction provoquée par la mycolysine croît très vite dès que l'infection microbienne s'établit : cette hyperphagocytose considérable amène la résolution.

Au contraire, l'hyperleucocytose produite par l'électrargol

et le nucléinate de soude est beaucoup moins élevée et elle n'empêche pas la formation de l'abcès.

10° L'injection préventive intraveineuse de mycolysine a également empêché la mortalité du lapin, malgré l'injection intraveineuse de 50 millions de staphylocoques qui a tué le lapin témoin au bout de vingt-quatre heures.

11° L'action préventive de la mycolysine contre l'infection streptococcique du lapin est moins constante que son action préventive contre l'infection staphylococcique.

J'ai préservé 3 lapins sur 4 en injectant préventivement chaque jour, pendant quatre jours, avant l'infection streptococcique, 2 cent. cubes de mycolysine dans les veines.

12° L'injection sous-cutanée préventive de mycolysine, répétée pendant deux jours, a préservé 3 rats blancs sur 5 contre l'infection pneumococcique dans le péritoine, tandis que les cinq témoins sont morts en vingt-quatre heures.

13° La mycolysine n'exerce pas d'action directe sur les microbes : ni agglutination, ni sensibilisation ; elle agit en augmentant le pouvoir opsonique du sérum et en stimulant la phagocytose.

INFLUENCE

DE LA LÉCITHINE ET DE LA CHOLESTÉRINE

SUR LA TOXICITÉ DES ŒUFS ET DES OVAIRES

par HENRI VIGNES

(Travail du laboratoire du Dr Salimbeni.)

La toxicité du parenchyme ovarien a été établie par de très nombreux travaux ; elle est plus marquée que celle du testicule dans la proportion de 39 à 233 (Loisel) et elle est surtout due à la présence des ovules (Loisel).

Phisalix, puis Robert Lévy, ont montré que les œufs de certaines espèces attirent au moment de l'ovogénèse des substances toxiques qui sont autrement employées en d'autres moments, de même que Albo avait montré l'utilisation des alcaloïdes pour la maturation des graines. Cette affinité, d'ailleurs, existe pour un grand nombre de toxines : Metchnikoff et Matchinsky l'ont constaté les premiers pour la toxine tétanique ; elle constitue une propriété fondamentale du *germen*.

Par ailleurs, un grand nombre de travaux ont établi l'action antitoxique des lipoïdes. En ce qui concerne l'ovaire, Ciaccio a vu l'augmentation des lipoïdes ovariens en rapport avec la maturation de l'œuf ; Mulon signale les lipoïdes de l'ovaire et du corps jaune dans ses recherches histochimiques sur les graisses antitoxiques. Ces substances, par leurs propriétés physico-chimiques, ont sans doute une fonction antitoxique à l'égard des toxines qu'adsorbe l'ovule ; elles permettent peut-être même de les utiliser en sorte qu'elles seraient le substratum de la fonction dite de sécrétion interne.

C'est en m'inspirant de toutes ces recherches que j'ai institué une série d'expériences sur cette action antitoxique des lipoïdes vis-à-vis des extraits d'ovaires et d'œufs.

J'ai employé trois sortes d'extraits :

1° Extrait d'ovaire de truie obligeamment mis à ma disposition par M. Choay (ovaire desséché dans le vide et à basse température, pulvérisé, délipoïdé, mis en solution dans l'eau physiologique, telle qu'un centimètre cube corresponde à 0,10 d'extrait et à 0,60 de glande desséchée, puis porté à l'ébullition rapide) ;

2° Extrait d'œufs de hareng ayant subi la même préparation (0,50 d'extrait, 1 gr. 50 d'œufs) ;

3° Extrait d'œufs de hareng ayant subi la même préparation, sauf l'ébullition (même titre). Les injections de ces trois extraits ont un effet analogue ; toutefois, le troisième est plus actif que les deux autres.

Comme lipoïdes, j'ai utilisé la cholestérine et la lécithine à l'état de pureté telles qu'on les trouve dans le commerce ; je les ai mises en suspension dans les solutions d'extraits par un broyage soigneux au mortier d'agate.

Premier groupe d'expériences. — Injection d'extrait. — *Mort.*

Le 19 septembre 1913, j'injecte 1 gramme d'extrait n° 3 (non chauffé) dans la veine de l'oreille d'un lapin mâle pesant 890 ; il pèse 910 le 20, 880 le 22, 870 le 23, 840 le 25, 710 le 29, et meurt le 7 octobre, pesant 640 grammes.

J'ai obtenu des résultats analogues avec un cobaye femelle du poids de 370 (injection sous-cutanée de 1 gramme d'extrait n° 3) et une souris femelle (injection sous-cutanée de 0,10 d'extrait n° 1).

Deuxième groupe. — Injection d'extrait. — *Baisse de poids notable.*

J'injecte, le 16 avril 1913, 0 gr. 10 d'extrait ovarien à un cobaye femelle du poids de 560. Il pèse 547 le 17, 555 le 18, 507 le 21, 433 le 23, 467 le 24. Le 23, la perte de poids est maxima, elle atteint 1/5,6 du poids initial.

J'obtiens des résultats analogues dans onze cas où j'ai pratiqué soit une, soit deux, quatre, cinq et jusqu'à huit injections (sous-cutanées ou intraveineuses) des trois extraits.

Je n'ai relevé qu'une exception : c'est celle d'une souris pleine de 25 grammes à qui j'ai injecté 0,10 d'extrait ovarien et qui a augmenté.

La perte moyenne de poids, déduction faite de cette exception, a été de 1/6,8.

Troisième groupe. — Injection d'extrait et de lécithine.

Perte de poids minime ou nulle. Pas de mort.

J'injecte 1 gramme d'extrait additionné de lécithine n° 3 à un cobaye femelle du poids de 370 grammes. Le poids du cobaye diminue d'abord, puis augmente.

La perte maxima est de 1/9. Pendant ce temps, un autre cobaye femelle, qui a reçu de l'extrait seul, meurt. (Voir cobaye du premier groupe.)

Trois expériences analogues avec les trois extraits : les pertes de poids sont respectivement de 0—1,26 et 1,12, la perte moyenne est donc de 1/17,2.

QUATRIÈME GROUPE. — INJECTION D'EXTRAIT ET DE CHOLESTÉRINE.

Perte de poids minime. Pas de mort.

J'injecte sous la peau 1 gramme d'extrait n° 3 non chauffé, additionné de cholestérine, à un cobaye femelle de 390 grammes. Le cobaye diminue, puis augmente, la perte maxima est de 1/7,8; pendant ce temps, le cobaye qui a reçu l'extrait seul est mort et celui qui a reçu la lécithine a perdu 1/9 de son poids, ainsi que nous l'avons vu.

J'ai fait deux expériences analogues avec les deux autres extraits. La perte de poids moyenne a été de 1/9,4.

*
* *

L'extrait d'œufs de harengs, chauffé et surtout non chauffé, manifeste donc, de même que l'extrait d'ovaire de truie, une action toxique lente se traduisant par une perte de poids progressive qui parfois peut aller jusqu'à la cachexie et même la mort.

La lécithine et, à un moindre degré, la cholestérine diminuent cette action toxique des extraits génitaux femelles : dans certains cas, les animaux qui ont reçu une injection d'extrait additionné de lipoïde ont résisté, alors que les témoins mouraient, et dans les autres cas leur perte de poids relative a été moindre que celle des témoins.

*
* *

Dans une autre expérience, j'ai pratiqué à des cobayes femelles l'injection d'une seule dose (0,10 et 0,20) de lipoïdes extraits d'ovaires de truie et j'ai également obtenu une perte de poids notable (1/5,3 et 1/4,5). (Lipoïdes préparés par M. Choay.)

Or, étant donné que les injections de lécithine et de cholestérine à l'état de pureté ne déterminent pas de diminution de poids appréciable, — bien au contraire, — deux hypothèses sont permises pour expliquer ce dernier résultat ; ou bien, à côté de la lécithine et de la cholestérine, existent dans l'ovaire un ou plusieurs lipoïdes toxiques, ou bien, par les moyens employés,

on ne peut séparer des lipoïdes ovariens la totalité des substances toxiques et une partie reste fixée sur ces lipoïdes, pour constituer des complexes très actifs.

*
* *

J'ai entrepris ces expériences à l'occasion de recherches sur la menstruation. J'ai pensé en effet que, dans l'étude de ce phénomène, il y a place pour des travaux procédant par voie synthétique, et je crois que le cytoplasme ovarien et l'ovule accumulent certains produits du métabolisme général (dans l'espèce les extraits) et les utilisent pour la fécondation et la menstruation au moyen de combinaison avec divers produits (dans l'espèce les lipoïdes) amenés à l'ovaire ou créés par lui, le tout suivant un cycle bien déterminé.

Il faut rapprocher de ces expériences et de ces hypothèses, les observations cliniques de Wilczinski, qui a vu la lécithine à dose quotidienne de 0 gr. 5 retarder et diminuer l'écoulement menstruel.

En résumé, je crois qu'il ne faut pas parler du produit de la sécrétion interne de l'ovaire, mais de son action de présence. La chimie génitale a ses dates, comme l'histologie du tractus utéro-ovarien et comme toute la vie génitale de la femme.

BIBLIOGRAPHIE

Albo. — *Archives italiennes de Biologie*, 1900, t. XXXIII, p. 73.

Ciaccio. — Les lipoïdes intracellulaires. *La Biologie médicale*, 1912, p. 336.

Lévy. — Relations entre l'arachnolysine et les organes génitaux femelles de l'araignée. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, séance du 8 janvier 1913.

Loisel. — *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 28 mai 1904, p. 883, et 16 juillet 1904, p. 133.

Matchinski. — De l'atrophie des ovules, etc. *Annales de l'Institut Pasteur*, mars 1900, p. 113.

Mulon. — Sur l'existence des graisses antitoxiques. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 12 novembre 1910.

Phisalix. — Corrélations fonctionnelles entre les glandes à venin et l'ovaire. *Le Progrès médical*, 9 avril 1904.

Wilczinski. — Cité dans la *Semaine médicale*, 1909, p. 165.

Le Gérant : G. Masson.

Paris - L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

28e ANNÉE MAI 1914 N° 5

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

SUR LA FLORE INTESTINALE DES CHAUVES-SOURIS

par Mlle TSIKLINSKY,
De l'Institut bactériologique de l'Université de Moscou.

(Avec la Planche XIII.)

Depuis les travaux de Metchnikoff et de son école sur la flore intestinale de l'homme et des animaux, on ne peut plus douter du rôle important que joue ce facteur dans la pathologie et la physiologie des êtres animés. On sait que les bactéries abondent particulièrement dans le gros intestin, qui atteint son plus grand développement chez les mammifères.

A mesure que l'on obtient de nouvelles données sur l'étude de la flore intestinale, on constate que celle-ci diffère chez les divers représentants de cette classe d'animaux, suivant la conformation de leur intestin, leur genre de nourriture, la rapidité de leur digestion, leur genre de vie et peut-être d'autres facteurs, qui nous sont encore inconnus. Tandis qu'on trouve une flore intestinale très riche chez les ruminants et aussi chez d'autres herbivores, par exemple, chez les chevaux (Choukewitch) [1] ou bien encore chez les omnivores, notamment les porcs (Barikine) [2], il y a d'autres mammifères qui nous frappent, au contraire, par la pauvreté de leur flore intestinale. Tel est surtout le cas des chauves-souris.

Le premier travail consacré à l'étude de la population bactérienne de l'intestin de la chauve-souris, est dû à Metchnikoff et à Distaso [3]. Ils ont étudié une des grandes espèces de la chauve-souris frugivore, connue sous

le nom de « roussette » (*Pteropus medius*), dont les exemplaires avaient été importés des Indes.

Ces auteurs ont remarqué la pauvreté surprenante de la flore intestinale de ces mammifères : il n'y avait presque pas de bactéries dans les préparations étalées faites de leurs excréments : on n'en trouvait que par endroits parmi les restes non digérés des fruits qui composent la nourriture des roussettes. En même temps on ne remarquait dans leurs déjections aucun processus de putréfaction, même pas d'odeur de pourriture, mais au contraire, une odeur de bananes ou de pommes, c'est-à-dire des fruits qui constituaient la nourriture de ces animaux.

Metchnikoff, constatant la pauvreté de la flore intestinale des roussettes, fait observer la conformation particulière de leur intestin. On sait que, contrairement à tous les autres mammifères, la chauve-souris a le gros intestin peu développé : il n'a qu'une très petite longueur et son diamètre n'est pas plus grand que celui de l'intestin grêle. Quant au cæcum, il fait complètement défaut. Selon les observations d'Eimer [4], le gros intestin des chauves-souris diffère aussi de celui des autres mammifères par sa fonction et par sa structure histologique : il est pourvu de glandes comme l'intestin grêle et il s'y passe, mais à moindre degré, le même processus de digestion.

En outre, la digestion des chauves-souris se fait extrêmement vite et la défécation se produit chez elles une heure et demie ou deux heures après l'absorption de la nourriture, de sorte que les résidus de la nourriture n'y séjournent pas ; les conditions favorables au développement des bactéries n'existent donc pas. C'est par cette pauvreté de la flore intestinale chez les chauves-souris que Metchnikoff s'explique leur longévité. Elles ont vécu de quinze à dix-sept ans et plus en captivité, et elles avaient été déjà prises adultes. Ceci constitue une longue période de vie comparativement à beaucoup d'autres mammifères, par exemple aux ruminants, dont le cycle vital [5] est court et dont la flore intestinale se caractérise, nous l'avons vu, par une richesse particulière. L'éléphant, qui constitue par sa longévité une exception parmi les herbivores, a relativement une flore intestinale très pauvre, si l'on juge d'après les recherches de Barikine.

Les recherches de Metchnikoff et Distaso concernaient la flore intestinale des chauves-souris frugivores habitant les régions tropicales. Il nous a paru très intéressant de nous faire une idée sur la population intestinale de nos chauves-souris ordinaires ; elles se nourrissent, comme on sait, d'insectes, sont analogues par la conformation de leur intestin aux chauves-souris déjà citées et se caractérisent, par conséquent, par l'absence du cæcum et par le développement peu considérable du gros intestin. C'est dans le but d'éclaircir cette question que j'ai entrepris l'étude de la flore intestinale chez les chauves-souris habitant les régions tempérées.

Dans son travail récemment paru, Bertarelli [6] a exposé les résultats de ses recherches sur la flore intestinale des animaux

hibernants et, entre autres, des chauves-souris insectivores. Sans étudier systématiquement la population microbienne de ces dernières, l'auteur fait observer qu'elle se distingue par sa grande pauvreté.

Nous avons fait nos recherches personnelles sur quelques espèces des chauves-souris ordinaires (*Vespertillo*, *Vesperugo*, *Plecotus*, *Myotis Daubentonia*) habitant les gouvernements du centre de la Russie. Les recherches ont été faites sur les souris récemment tuées, ou, plus rarement, attrapées vivantes. Dans ce dernier cas, elles étaient mises à mort à l'aide du chloroforme. On pratiquait immédiatement l'autopsie; on observait généralement le tube digestif tout entier, depuis l'estomac jusqu'au rectum inclusivement, et on l'enlevait, pour plus de commodité, en le transportant dans la boîte stérilisée de Petri. Ce qui sautait aux yeux, c'est que l'estomac et toutes les parties de l'intestin étaient trop remplis de nourriture, surtout alors que l'animal avait été attrapé tard le soir et qu'il avait eu le temps de se rassasier. La plupart du temps, le contenu de l'intestin avait une couleur sombre, presque noire, et était de consistance dure.

Les recherches furent faites suivant la méthode suivante : on faisait tout d'abord les préparations microscopiques avec le contenu de l'estomac et des différentes parties de l'intestin, ensuite les ensemencements sur des différents milieux nutritifs.

Comme l'analyse microscopique des excréments manifestait soit l'absence complète de bactéries, soit une quantité très peu considérable, une ou deux bactéries, parfois même aucune, dans le champ visuel, l'ensemencement du contenu intestinal se faisait sans dilution préalable. Des parcelles d'excréments étaient directement ensemencées dans les milieux nutritifs (gélose, pomme de terre, gélatine et autres) et, après le développement, on effectuait des cultures pures à l'aide des procédés habituels. Il est intéressant de noter que les excréments de la chauve-souris, récemment prélevés, ne répandaient aucune mauvaise odeur, tandis que les cultures obtenues dans des tubes, après l'ensemencement des parcelles des excréments, répandaient dans presque tous ces tubes une très forte odeur fétide. Avec ce fait s'accordent les indications de beaucoup de zoologistes, que dans les gîtes des chauves-souris, leurs excré-

ments, qui s'amassent en quantité incroyable, dégagent une très forte odeur désagréable, de sorte qu'il est plus facile parfois de découvrir l'habitation des chauves-souris par l'odorat que par la vue [7]. Ceci peut être aussi expliqué par le fait que les bactéries se développent non pas dans l'intestin des chauves-souris, où elles ne sont qu'en petite quantité, mais en dehors de lui, éliminées en même temps que les excréments. Elles n'ont pas le temps de se reproduire dans l'intestin, car les chauves-souris émettent ces déjections très souvent, grâce à quoi leur intestin est toujours nettoyé par un procédé tout mécanique. Ce dernier fait a été démontré par Metchnikoff [8] dans ses expériences sur les *Pteropus medius* : ayant mélangé à leur nourriture une culture de *Bac. prodigiosus*, Metchnikoff trouvait au bout de trois heures dans les excréments des chauves-souris ces bactéries tout à fait vivantes, mais deux ou trois heures après on ne les décelait plus : le *Bac. prodigiosus* disparaissait complètement des intestins.

Je passe maintenant à la description du tableau microscopique des excréments des chauves-souris, observé par moi. Ce sont les résidus de la nourriture non digérée qui sautent tout d'abord aux yeux dans des préparations étalées : des têtes d'insectes mangés, des parties de pattes rongées, des ailes, parfois une cuisse entière, la poussière des ailes des papillons très souvent, etc. (Planche XIII, fig. I). Presque pas de bactéries ; rarement quelques cocco-bacilles, qui ne se colorent pas par la méthode de Gram et rappellent le *Bact. coli commune* (Planche XIII, fig. II) ; on trouve également un autre bâtonnet, ne se colorant pas non plus par le Gram, mais un peu plus gros que le *Bact. coli commune*. Nous parlerons plus bas de ces bâtonnets.

J'ai étudié en tout 19 chauves-souris appartenant aux espèces déjà mentionnées et en outre les chauves-souris grises ordinaires, qui se tiennent habituellement près de l'eau.

Le tableau microscopique du contenu intestinal de ces diverses espèces n'offre pas de différence : partout le même tableau, décrit ci-dessus.

Dans les cultures obtenues par l'ensemencement des matières fécales, on a obtenu le *Bact. coli commune* dans tous les cas sans exception. On isolait en même temps habituellement le *Bac. prodigiosus*, ensuite un petit bâtonnet appartenant au groupe

des bâtonnets pseudo-diphtériques ; la sarcine jaune, le coccus orangé et un petit bâtonnet, qui sécrète un pigment vert, se rapprochant de près par ses propriétés du *Bac. pyocyanique* et du bacille fluorescent liquéf. ; mais il n'est pas identique : il s'en distingue par la température optima de son développement et, notamment, se développe le mieux à la température de la chambre, tandis qu'à 37 degrés il pousse très lentement et n'élabore pas de pigment ; il n'est pas pathogène. Des recherches ultérieures doivent nous démontrer si cette bactérie constitue une espèce nouvelle, ou si elle n'est qu'une variété physiologique des bâtonnets qui nous sont déjà connus. On a isolé aussi fréquemment, presque dans tous les cas, des moisissures habituelles : *Mucor*, *Aspergillus*.

Omettant la description des bactéries isolées bien connues, je ne m'arrêterai que sur celles qui offrent un intérêt spécial.

Dans le nombre des bactéries isolées, deux sont particulièrement intéressantes :

1° L'une d'elles, le *bâtonnet brun*, a été obtenue d'une grosse espèce des chauves-souris, *Myotis Daub.* (Fig. 1, ci-après).

J'ai eu trois exemplaires de cette espèce et, à chaque ensemencement du contenu intestinal, j'ai constaté ce même bâtonnet. Au bout de huit à dix heures, la gélose sur laquelle était fait l'ensemencement brunissait déjà dans toute son épaisseur ; il se formait en outre à sa surface un enduit blanc sale, qui brunissait aussi avec le temps. C'est de cet enduit qu'on a isolé une culture pure du bâtonnet brun. Quant aux caractères morphologiques, c'est un bâtonnet assez mince, qui, parfois, se groupe par deux, comme le diplobacille, parfois se dispose parallèlement en deux ou plusieurs rangées. Il s'allonge quelquefois en des filaments assez longs ; il se caractérise par une motilité énergique ; les bactéries s'élancent dans tous les sens du champ visuel, donnant l'impression d'un vol rapide ; il se colore bien avec les couleurs d'aniline habituelles, mais tous les individus ne se colorent pas uniformément, certains se colorent mieux aux pôles ; il ne prend pas le Gram, ne forme pas de spores ; c'est un anaérobie facultatif ; il pousse bien dans tous les milieux nutritifs ordinaires. Il trouble uniformément le bouillon, qui prend un aspect sale et devient foncé au bout de quelque temps. Il se forme un dépôt épais au fond, une pellicule friable à la surface ; sur la gélose, il se forme le long de la strie un enduit blanc, qui brunit, le troisième, quatrième et quelquefois le second jour ; la gélose tout entière prend une teinte brune, qui devient avec le temps de plus en plus intense. Il liquéfie très rapidement et énergiquement la gélatine, d'abord en forme d'entonnoir, le long de la piqûre, et plus tard complètement dans tout le tube ; on observe dans ce cas au fond un dépôt épais, tandis que la gélatine reste transparente. Sur la pomme de terre, au bout de vingt-quatre heures, ce bâtonnet forme un enduit brun-rouge ; avec le temps, il devient plus abondant et d'une couleur plus

intense. Il coagule le lait, le coagulum tombe au fond, et on voit à la surface une grande quantité de sérum de lait transparent. La culture dégage une odeur d'acide butyrique. Ce bâtonnet forme de l'indol dans l'eau peptonée et dans le bouillon; il pousse abondamment dans le bouillon additionné d'un morceau de blanc d'œuf coagulé; il peptonise énergiquement l'albumine, qui se détruit rapidement. Sur la gélatine les colonies ont une forme ronde avec les bords plats; elles se liquéfient rapidement, et, le troisième jour, la plaque entière est liquéfiée. Sur la gélose, les colonies n'offrent rien de caractéristique : elles sont rondes, à bords plats, le centre plus dense que les bords, teintées de brun. La plaque tout entière brunit. Quant à ses propriétés fermentatives par rapport aux différents hydrates de carbone, ce bâtonnet fait fermenter le glucose, le fructose, le galactose, le maltose, la mannite et la dextrine,

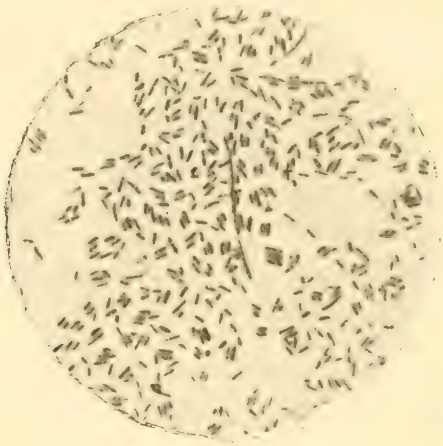


Fig. 1. — Le bacille brun.
Culture de 20 heures sur gélose. Coloration à la fuchsine diluée. Gross. 1.500 fois.

mais il ne décompose pas le saccharose et le lactose, ce qui prouve l'absence des ferments correspondants : l'invertine et la lactase. Au cours de son développement dans les milieux hydrocarbonés indiqués, auxquels on ajoute de la teinture de tournesol, on observe une propriété réductrice de ce bâtonnet : le tournesol se décolore douze heures après l'ensemencement; il revient ensuite à sa première couleur bleue. Le tournesol reste invariablement bleu dans les tubes de lactose et de saccharose, rouge vif dans tous les autres, la dextrine exceptée ; au bout de vingt-quatre à trente-six heures, la dextrine se décompose faiblement et le milieu prend une couleur violacée. Ce bâtonnet ne forme pas de gaz, et, dans le milieu de Rothberger (gélose sucrée teintée de rouge neutre), ne change presque pas de couleur. Il possède des propriétés pathogènes pour les animaux : quand on inocule sous la peau d'un cobaye 1/2 cent. cube d'une culture en bouillon, l'animal est tué dans l'espace de dix-huit heures. On constate à l'autopsie un fort exsudat dans la cavité abdominale. L'analyse microscopique y décèle, ainsi que dans tous les organes, la présence des bâtonnets en question; l'ensemencement du sang du cœur donne un développement abondant de ce même bâtonnet.

En examinant la littérature bactériologique dans le but d'identifier le bâtonnet qui nous occupe, on ne peut pas ne pas noter ses rapports étroits avec le bâtonnet brièvement décrit par Matchek en 1887 et isolé par lui de l'eau. L'auteur fait observer, il est vrai, que son bâtonnet avait de petites spores étroites, qui se coloraient faiblement, mais il est possible qu'il ne s'agissait que de la coloration inégale des bâtonnets, d'autant plus que l'auteur ne dit rien de leur résistance à une température élevée. Dans nos expériences, le chauffage des cultures de cette bactérie dans un bain-marie les tuait complè-

Fig. 2. — Le bacille fétide.
Culture de 20 heures sur gélose. Coloration à la fuschine diluée. Gross. 1.500 fois.

tement au bout d'une demi-heure à 80 degrés et au bout de deux heures à 60 degrés. De plus, en étudiant les cultures de ce bâtonnet à l'état vivant, je n'ai jamais pu voir le tableau habituel des spores vivantes non colorées sous forme de petits corps brillants, réfractant fortement la lumière.

2° *Le bâtonnet fétide* : c'est un bâtonnet court et épais, peu mobile, se disposant par deux et en amas. On trouve quelquefois des exemplaires plus longs (Fig. 2).

Il ne forme pas de spores, ne prend pas le Gram, se développe abondamment dans tous les milieux nutritifs en donnant lieu à une forte odeur très désagréable, qu'on sent à distance. Il est possible que la mauvaise odeur des excréments des chauves-souris, dont parlent les travaux des zoologistes, doive son origine à la présence de ce bâtonnet. Cette odeur, très forte au

moment où l'on isole le bacille fétide de l'intestin, faiblit avec le temps. C'est un anaérobie facultatif. Sur la gélose, il forme de grosses colonies rondes, irisées au bord. Sur gélatine les colonies sont rondes aussi avec un centre nettement marqué, autour duquel se forme bientôt la zone de liquéfaction. Les bords sont plats et bien découpés.

Les cultures obtenues de ces colonies se développent abondamment dans tous les milieux nutritifs : sur la gélose, en enduit abondant, friable et brillant; les jeunes cultures sont fortement irisées. Le bouillon se trouble uniformément et il se forme au fond un dépôt; la gélatine se liquéfie rapidement, mais au fond du tube il reste assez longtemps une partie de la gélatine non liquéfiée. La partie liquéfiée se trouble fortement. Le lait se coagule en formant de l'acide butyrique. Le développement sur pomme de terre prend l'aspect d'un enduit épais, blanc et brillant. Dans le milieu de Rothberger et Omeliansky, le bacille fétide dégage du gaz. Dans le bouillon auquel on a ajouté du blanc d'œuf cuit, il pousse abondamment, mais n'attaque pas le blanc d'œuf. Le bâtonnet ne possède aucune propriété pathogène et, inoculé sous la peau d'un lapin ou d'un cobaye, à la dose de 1/2 à 1 cent. cube, il ne provoque aucun phénomène local ou général. En ce qui concerne son action sur les hydrates de carbone, il fait fermenter énergiquement le glucose, le fructose, le levulose, le galactose, le maltose et la mannite; quant au saccharose et à la dextrine, les milieux nutritifs qui en contiennent, teintés avec la teinture de tournesol, prennent une couleur violacée pendant le développement de cette bactérie.

La flore intestinale anaérobie des chauves-souris, se distingue également par une pauvreté extrême. Dans certains cas l'on n'a pas trouvé du tout d'anaérobies stricts.

En terminant la première partie de ce travail, concernant la population bactérienne des chauves-souris insectivores, je ne puis passer sous silence le fait suivant : comme nous l'avons déjà dit plus haut, Metchnikoff et Distaso ont constaté une grande pauvreté de la microflore intestinale des chauves-souris frugivores. Les résultats ci-dessus exposés de notre travail amènent à la conclusion que tout aussi pauvre est la population bactérienne des chauves-souris insectivores. Ce fait ressort avec plus de relief encore, si on le rapproche des recherches que j'ai faites sur quelques musaraignes (*Sorex araneus*, *Sorex minuta*) dont, contrairement aux chauves-souris, le tube digestif possède un gros intestin, bien développé, et un cæcum. Les musaraignes sont aussi au nombre des insectivores et peuvent, par conséquent, par le genre de leur nourriture, être comparées aux chauves-souris étudiées par moi. Cependant leur flore intestinale est plus abondante et plus variée. Les préparations microscopiques seules le prouvent déjà suffisamment. J'espère pouvoir prochainement fournir des données plus complètes sur la composition de la microflore

intestinale de ces insectivores et de certains autres. Pour le moment, je me bornerai à enregistrer ce fait incontestable. En comparant les musaraignes aux chauves-souris au point de vue de la population microbienne de leur intestin, nous obtenons la confirmation des idées de Metchnikoff sur le rôle décisif que joue le gros intestin dans le développement de la microflore intestinale. Les expériences décrites ci-dessus prouvent en outre, une fois de plus, que l'absence des bactéries dans l'intestin n'apporte aucun trouble dans la vie des êtres même aussi hautement organisés que le sont les mammifères.

Les chauves-souris, ainsi que les musaraignes, dont je me suis servie pour mon travail, m'ont été obligeamment fournies par S. J. et W. J. Ogneff, auxquels j'exprime à ce sujet ma sincère reconnaissance.

BIBLIOGRAPHIE

1. Choukewitch. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1911 et 1912.
2. Barikine. — *Journal médical de Charkoff*, février 1913 (en russe).
3. Metchnikoff et Distaso. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1909, n° 12.
4. Eimer. — *Virchow's Archiv für pathologische Anatomie*, t. XLVIII, f. I, p. 151.
5. Metchnikoff. — *Essais optimistes*, p. 108-111, 1907.
6. Bertarelli. — *Centr. f. Bakteriologie*, I Abt. Avril 1913.
7. Brehm. — *Les Vertébrés*. Vol. X. Dernière édition, 1913.
8. Metchnikoff. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1909, p. 953.

EXPLICATION DE LA PLANCHE XIII

Fig. I. — Contenu de l'intestin grêle de la chauve-souris.

Fig. II. — Contenu du gros intestin avec quelques bactéries et les restes de nourriture.

INFLUENCE DU MODE DE PÉNÉTRATION CUTANÉE OU BUCCALE DU « STEPHANURUS DENTATUS »

SUR LES LOCALISATIONS DE CE NÉMATODE DANS L'ORGANISME DU PORC ET SUR SON ÉVOLUTION

par P. Noel BERNARD et J. BAUCHE

(Travail des laboratoires de Hué et du laboratoire de M. Mesnil, à l'Institut Pasteur) (1).

(Avec la planche XIV.)

Depuis que l'anémie des mineurs en Europe et certaines anémies pernicieuses des pays chauds sont considérées comme des affections vermineuses provoquées par *Ankylostomum duodenale* (Dubini, 1843) et *Necator americanus* (W. Stiles, 1902), la biologie de ces vers est l'objet de nombreuses recherches.

Tout d'abord, on admet, après Perroncito, que les œufs de ces parasites évoluent dans le milieu extérieur jusqu'au stade de larve strongyloïde enkystée, et que ces larves s'introduisent par la voie buccale dans le tube digestif de leur hôte pour achever leur évolution.

En 1886, Leichtenstern [7] établit, par une série d'expériences d'ingestion de larves d'ankylostome que, la contamination peut se faire par la bouche.

En 1908, Looss apporte la preuve de la pénétration des larves d'*Ankylostomum duodenale* à travers la peau saine de l'homme et du chien. Les larves pénètrent, grâce à leurs mouvements actifs, par les points de clivage des couches épidermiques en voie de desquamation et par les follicules pileux. Elles gagnent les lymphatiques, les ganglions, le canal thoracique et les veines qui les portent au cœur droit. Arrivées dans le poumon, elles traversent les parois des alvéoles, remontent dans la

(1) Nous remercions MM. Railliet et Henry de l'accueil si bienveillant qu'ils nous ont fait dans leur laboratoire et des documents qu'ils ont mis si largement à notre disposition.

trachée et passent dans l'œsophage. Elles se rendent enfin dans l'intestin où elles atteignent l'état adulte.

Looss [8] réfute (1908-1911) les objections de Leichtenstern (1898), de Sandwith, de Pieri et de Grassi (1902) qui se prononcent pour le mode unique de pénétration buccale. Ses expériences sont reprises soit sur l'homme, soit sur le chien et le cobaye avec *Ankylostomum duodenale* et *Ankylostomum caninum*. Elles sont confirmées par Bentley (1902), T. L. Bancroft (1902), De Ménézès (1904), Schaudinn (1904), Lambinet (1905), Herman (1905), Calmette et Breton (1905), Tenholt (1905), Boycott (1905), Brunn et Müller (1905), Liefmann (1905), Pieri (1905), Alessandrini (1905), Smith (1905), Schüffner (1905) et par Ahsford, King et Gutierrez (Commission de l'anémie de Porto-Rico) (1906) (1).

Van Durme [14], en 1902, obtient l'infection de singes par la voie cutanée avec des larves de *Strongyloïdes* parasites de cet animal.

Vittorio Marzocchi [9] (1907) constate la pénétration de larves d'anguillules provenant d'un cas d'anguillulose infantile et d'anguillulose du lièvre jusqu'à la couche de Malpighi de la peau de l'oreille d'un lapin.

Katsurada et Hashegawa [5] réussissent (1910) à infester du trématode *Schistosomum japonicum* une chatte et un chien provenant de régions où le parasite est inconnu, en les plaçant dans une eau de rizière riche en miracidia de *Schistosomum*. Yonegi Miyagawa [15] obtient (1913) des résultats identiques. Il constate la présence de larves de trématodes dans les espaces conjonctifs de la peau et les voies lymphatiques.

La pénétration cutanée des larves de certains vers à travers la peau saine est donc considérée comme un fait définitivement acquis. Mais l'accord n'est pas établi sur l'importance relative des deux modes de pénétration par la bouche et par la peau. Un grand nombre d'auteurs pensent que l'eau de boisson, les légumes crus, les mains souillées de terre contenant des larves, les insectes qui se posent sur les aliments, l'air chargé de larves dans les galeries des mines réalisent les conditions naturelles

(1) Les références bibliographiques complètes de ces divers travaux se trouvent dans l'index bibliographique de la publication de Looss [8(2)].

les plus favorables au transport des parasites dans la bouche et le tube digestif. Looss soutient, au contraire, que la pénétration cutanée n'est pas une simple possibilité, qu'elle est le mode d'infection le plus facile et le plus fréquent. Les larves peuvent pénétrer par toutes les parties de la surface de la peau sauf, peut-être, par la paume des mains et la plante des pieds; les œufs d'ankylostome n'éclosent que dans des conditions déterminées d'humidité et de température; ces conditions sont réalisées précisément aux pays chauds dans les terres de culture, en Europe dans les mines, où les travailleurs incomplètement vêtus sont exposés au contact prolongé des boues contaminées.

Nous avons étudié à Hué (Annam), le *Stephanurus dentatus* Diesing, 1839, parasite du porc. Ce nématode nous a donné les moyens de rechercher expérimentalement quelle est l'importance relative, pour son évolution, de la pénétration cutanée ou buccale des larves dans l'organisme de leur hôte. Le *Stephanurus dentatus* siège principalement dans le tissu adipeux qui enveloppe les uretères et les reins. Il se rencontre dans le foie avec une fréquence variable suivant les pays d'élevage et dans les autres viscères tout à fait exceptionnellement.

I. — « STEPHANURUS DENTATUS » DIESING 1839
RÉSUMÉ HISTORIQUE ET MORPHOLOGIQUE

Ce parasite a été l'objet de nombreuses publications.

Il est décrit pour la première fois par Diesing [2] (1839) sur des échantillons prélevés par Natterer, au Brésil, sur les porcs de race chinoise.

Verrill (1870), ignorant les recherches antérieures, décrit, sous le nom de *Sclerostoma pinguicola*, un nématode envoyé de New-Haven et de Middletown (Etats-Unis), qui n'est autre que le *Stephanurus dentatus*, de Diesing (1).

Flechter (1871) attribue à ce nématode la mortalité considérable que le hog-choléra produit sur les porcs d'Indianopolis (Etats-Unis).

(1) Les références bibliographiques des travaux sur le *Stephanurus dentatus* jusqu'en 1899 se trouvent dans le mémoire de L. Tayler [13].

Morris, la même année, observe à Sydney (Australie) le même parasite et, sans connaître l'opinion de Flechter, lui attribue les ravages d'une « mysterious disease » qui sévit sur les porcs.

A Saint-Louis (Etats-Unis), 1874, Dean précise la présence du *Stephanurus*, qu'il désigne sous le nom de *Strongylus dentatus*, dans les couches adipeuses périrénales et périurétérales et exceptionnellement dans les autres organes. Il trouve les œufs dans le bassinet, l'uretère et l'urine. Mais il échoue dans la culture des œufs et, ne rencontrant dans les lésions que des parasites adultes ou à un degré d'évolution avancée, il admet que le développement de l'embryon doit se faire dans l'organisme d'un hôte intermédiaire.

Dinwidie (1892) à Arkansas, Lutz, au Brésil, estiment que l'importance des dommages que cause ce nématode se borne à la dépréciation, pour la consommation, des organes infestés.

Bancroft (1893) confirme sa présence en Australie et Magalhaès (1894) à Sao-Paulo (Brésil).

Louise Tayler [13] (Washington, 1899) signale la possibilité de cultiver les œufs recueillis dans l'urine et d'observer les premiers stades de l'évolution des larves. L'hypothèse de la transmission du parasite de l'animal infecté à l'animal sain, par l'eau et les aliments souillés de larves, lui paraît très vraisemblable.

Z. Hellmans [3] (1911) étudie le *Stephanurus* à Java et Sumatra. Il confirme l'élimination des œufs par les urines.

T. H. Johnston [4] (1912), au Queensland (Australie), n'a trouvé dans le foie que des formes immatures.

Dans un mémoire (1912) sur l'élevage et les animaux domestiques au Dahomey, G. Pécaud [10] fait une étude clinique précise de la stéphanurose très répandue dans ce pays. En outre des lésions autour de l'uretère et des reins, il décrit la localisation constante du parasite dans le foie, et sa présence tout à fait exceptionnelle dans le poumon, la rate et les reins. Il confirme l'expulsion des œufs avec l'urine. « Les embryons, ajoute l'auteur, doivent être ingérés avec les aliments que le porc trouve dans la terre. Arrivés dans le tube digestif, ils doivent le traverser facilement et passer dans le système porte. Dans le foie, ils se logent à l'extrémité des ramifications san-

guines et subissent là une dernière mue, à la suite de laquelle ils prennent les caractères sexuels et s'enkystent. Quelques-uns arrivent cependant à percer la paroi du kyste et tombent dans la cavité abdominale où ils vont s'accoupler et se loger dans la graisse qui entoure les uretères ». G. Pécaud, sur le travail duquel nous reviendrons, rapporte que Roubaud a trouvé des *Stephanurus* sur les porcs du Congo à Brazzaville (1).

Ce vers désigné sous le nom de *Stephanurus dentatus* Diesing, 1839, *Sclerostoma pinguicola* Werril 1870, *Stephanurus Nattereri* Cobold, 1879, appartient à l'ordre des Nématodes, à la famille des Strongylidés, à la sous-famille des Strongylinés.

Les échantillons recueillis en Annam répondent à la description suivante :

Vers cylindrique méromyaire de consistance molle, de couleur gris bleuâtre à l'état frais, blanchâtre après conservation dans le formol, à cuticule mince, transparente, finement striée transversalement, à stries espacées de 10 à 11 μ dans la partie moyenne du corps et de 8 à 9 μ aux extrémités. Bouche orbiculaire large de 250 μ, entourée de six papilles dont deux latérales plus grosses et submédianes.

Capsule buccale cyathiforme, à bord antérieur découpé en six festons, large de 250 μ environ, profonde de 210 μ. Deux glandes céphaliques volumineuses s'étendent en arrière jusqu'à 14 millimètres de la bouche.

Œsophage en forme de massue à peu près semblable dans les deux sexes, long de 1.700 à 1.800 μ, présentant un premier segment correspondant au manche de la massue, long de 400 à 450 μ, large de 200 μ environ et un second segment large de 600 à 650 μ dans sa partie moyenne.

Intestin débutant par une région moniliforme formée de trois renflements successifs et se continuant par une partie tubulaire beaucoup plus longue que le corps et obligée de décrire de nombreuses circonvolutions (fait exceptionnel parmi les nématodes). Cet intestin ne contient pas de sang.

Male. — Long de 2 cent. 50 à 3 centimètres, épais de 1mm10 à 1mm30. Bourse caudale formant une collerette dentelée sans membrane développée et comportant des côtes courtes et difficiles à observer : les antérieures fendues, les antérieures externes simples, les moyennes fendues, les postérieures externes naissant isolément, les postérieures tridigitées.

Deux spicules égaux, longs de 1 millimètre, cylindriques ailés et striés transversalement.

Femelle. — Longue de 28 à 30 millimètres, épaisse de 1mm50 à 2mm20. Extrémité caudale munie d'un appendice digitiforme, long de 430 μ et large de 270 μ à sa base et de deux grosses papilles latérales hémisphériques placées un

(1) Les travaux de Diesing (1839, 1845, 1851), de Dujardin (1845), de J. C. White (1858), de Molin (1861), de Carus (1863), de Werrill (1870), de Cobbold (1871-1879), de Lutz (1886), de Zurn (1882), de Leuckart (1886), de Neumann (1888), de Stiles et Hassall (1894), Magalhaès (1896), Word (1895), analysés par Louise Tayler [13], de Railliet [11 et 12] (1886-1896) discutent les caractères morphologiques du parasite et sa place parmi les nématodes.

peu en arrière du niveau de l'anus. Anus et vulve située respectivement à 700 μ et 1.250 μ de la pointe caudale. Vagin très court, une branche de l'utérus dirigée en avant, l'autre en arrière mais ne tardant pas à décrire une boucle pour revenir en avant.

Œufs. — Ovoïdes, long de 90 μ, larges de 65 à 70 μ (dans le formol), pondus à un stade avancé de segmentation.

II. — LÉSIONS DÉTERMINÉES PAR LA MALADIE NATURELLE

Nous avons observé le *Stephanurus* sur 34,6 p. 100 des porcs abattus pour la consommation. Sur 100 animaux infectés, le parasite se trouve cent fois autour des uretères et des reins, quatre fois dans le parenchyme hépatique. Sa présence dans le poumon est extrêmement rare. Nous ne l'avons rencontré ni dans la rate, ni dans les autres viscères.

Les animaux parasités ne se distinguent des animaux sains par aucun symptôme apparent. Les porcs sont abattus d'ordinaire à un âge qui varie entre six mois et deux ans.

A l'ouverture du cadavre, l'aspect général des muscles, de la graisse est normal. L'attention est attirée tout d'abord par l'épaississement des masses cellulo-adipeuses qui entourent les uretères et les reins, surtout du côté gauche. Au toucher, on sent à travers la graisse de petites masses plus consistantes donnant la sensation de minces cordelettes. Dans les cas d'infection massive, le tiers supérieur de l'uretère, le rein, les capsules surrénales constituent une même tumeur adipeuse, mamelonnée. Lorsqu'on incise la tumeur, elle apparaît creusée de cavités irrégulièrement disséminées dans la masse. Chacune d'entre elles contient deux vers, plongés dans un liquide visqueux de couleur verdâtre. Quelques-unes sont vides. Les parasites sont groupés par couples, mâle et femelle. Les femelles sont bourrées d'œufs. Une section longitudinale depuis le bassinet jusqu'à la vessie montre que l'uretère est en quelque sorte l'axe de la masse hypertrophiée qui s'est développée aux dépens du tissu cellulo-adipeux périurétéral. La muqueuse de l'uretère est soulevée dans le tiers supérieur du conduit par de petites saillies qui présentent, en leur centre, un pertuis très fin (Fig. 1, ci-après). Un stylet introduit dans chacun d'entre eux pénètre dans une des cavités kystiques qui, toutes, communiquent ainsi librement par un canalicule avec la lumière de

Fig. 1. — Aspect macroscopique des lésions péri-urétérales, provoquées par *Stephanurus dentatus* : *a*, rein ; *b*, tumeur incisée longitudinalement ; on aperçoit sur la ligne médiane des saillies de la muqueuse, orifices des canalicules qui font communiquer l'uretère et les cavités où sont logés les parasites ; *c*, uretère normal.

l'uretère. Quelquefois, un parasite est à demi engagé dans ce canalicule. L'urine de la vessie contient un très grand nombre d'œufs. L'examen des urines des porcs vivants permet de faire le diagnostic de la maladie. La centrifugation de l'urine de 111 animaux a donné 141 fois des œufs au stade de morula parmi lesquels se trouvaient, 3 fois, des embryons fraîchement éclos.

Quand le tissu cellulaire périrénal est envahi, dans les cas les plus accentués, tout autour de la capsule fibreuse l'atmosphère celluleuse est creusée de cavités qui contiennent des parasites et une substance crémeuse verdâtre. La capsule fibreuse reste intacte et il n'y a pas de communication entre les cavités purulentes et le parenchyme rénal.

Quatre sur cent des animaux porteurs de lésions rénales présentent en même temps des lésions hépatiques. Le foie congestionné pèse parfois le double de son poids normal. La surface est marquée de nodules blanchâtres variant de la dimension d'une lentille à celle d'un gros haricot. La section de ce tissu, de consistance fibreuse, met en liberté un parasite à un stade plus ou moins avancé de son évolution. Ce parasite est toujours unique. Si on pratique sur la masse de l'organe de larges incisions, la coupe montre un tissu congestionné, sillonné par endroits de bandes fibreuses. Dans les cas les plus graves, au niveau du hile du foie, la veine porte est enserrée dans un paquet de ganglions tuméfiés, ramollis.

Les parasites recueillis dans le foie et la veine porte ne contiennent jamais d'œufs. L'examen des fèces n'a permis dans aucun cas de déceler la présence d'œufs dans le tube digestif.

Dans le poumon nous avons, tout à fait exceptionnellement, rencontré un parasite isolé et incomplètement évolué. Les autres organes nous ont toujours paru indemnes.

La viande des animaux abattus est très saine. Seuls les organes infectés sont rejetés de la consommation.

La bénignité relative de la stéphanurose à Hué contraste avec la gravité de cette affection dans certains pays. Pécaud notamment insiste sur la cachexie profonde des porcs du Dahomey, où les lésions hépatiques sont aussi fréquentes que les kystes péri-urétéraux. Ce pouvoir pathogène du *Stephanurus* paraît lié à l'importance de sa localisation dans le foie. S'il est

vraisemblable d'admettre que les vers qui se développent très exceptionnellement dans le poumon ou la rate sont des « parasites erratiques », il semble bien que leur localisation dans le foie et autour de l'uretère doit être subordonnée à des influences précises. La reproduction expérimentale des diverses formes de l'infection pouvait seule permettre de les déterminer.

III. — INFECTION EXPÉRIMENTALE

A. — Cultures des larves.

Les œufs sont recueillis par centrifugation de l'urine prélevée dans la vessie. Ils sont mis en incubation dans des boîtes de Petri contenant une mince couche d'urine additionnée de noir animal, suivant le principe de Looss, mais dans des conditions telles que la pâte soit très fluide. Les boîtes sont maintenues à une température oscillant entre 25 et 35 degrés.

Dans la vessie, les œufs ont de 100 à 120 μ de long sur 55 μ de large. Quelques heures après leur immersion dans le milieu de culture, on voit dans l'œuf, qui mesure de 125 à 128 μ de long sur 60 μ de large, l'embryon mobile décrivant des 8 de chiffre. L'embryon sort de l'œuf en moyenne après vingt-quatre heures d'incubation. A ce moment il a une forme cylindrique, amincie à l'extrémité antérieure et effilée en alène à l'extrémité postérieure. Il mesure 500 μ de long sur 32 μ de large. Le corps est granuleux dans ses deux tiers postérieurs et plus clair dans son tiers antérieur. La bouche est orbiculaire (4 à 5 μ de diamètre). Le pharynx, cylindrique, long de 10 à 14 μ et large de 2 à 3 μ, est muni à sa partie antérieure de 2 petites dents chitineuses de forme linéaire. L'œsophage présente sur sa longueur, de 140 à 150 μ, deux bulbes dont l'un a 8 à 10 μ de large et le second de 12 à 15 μ. L'intestin, filiforme, décrit des sinuosités jusqu'à 110 à 120 μ de l'extrémité caudale où se dessine l'anus. Environ cinq jours après l'éclosion, la larve mue et se transforme en larve strongyloïde enkystée. Elle mesure dans sa gaine 600 μ de long et 40 μ de large. La gaine dépasse l'extrémité antérieure de quelques μ et l'extrémité postérieure de 50 à 70 μ. La bouche, orbiculaire, infundibuliforme, se continue par un œsophage de 135 à 140 μ de long terminé par un bulbe allongé de 20 μ de large. L'intestin, sinueux, se déroule dans la cavité générale bordée par des cellules granuleuses régulières jusqu'à l'anus, situé à 50 μ de l'extrémité postérieure. Cette extrémité ne se termine plus en alène, mais en tronc de cône allongé.

Sous cette forme enkystée, la larve peut rester vivante dans le milieu de culture plus de 50 jours. Que l'enkystement soit récent ou ancien, dès que l'on dépose une goutte de culture sur la peau du porc, les larves reprennent une grande mobilité et se groupent au point d'émergence des poils.

B. — Dispositif de l'expérience.

Pour étudier les modes de pénétration de ces larves dans l'organisme de leur hôte, trente porcelets, âgés de deux à trois mois et isolés dès l'âge de un mois, ont été soumis à l'expérimentation suivante :

1° Un premier groupe de six animaux fait deux à six repas infectants composés de riz cuit additionné d'une culture riche de larves. Ces animaux sont isolés dans des cages élevées au-dessus du sol, sur litière sèche, dans des conditions telles que la contamination par la peau ne soit pas possible ;

2° Un deuxième groupe de neuf porcelets est exposé à la pénétration cutanée. Des cultures âgées de douze à trente-cinq jours sont étalées deux heures par jour pendant quatre à six jours consécutifs sur l'abdomen et les flancs de l'animal immobilisé. A la fin de chaque opération, la région badigeonnée est lavée largement pour que l'animal ne puisse, en aucune façon, introduire dans la cavité buccale les larves collées à la surface de la peau. Il est isolé ;

3° Les quinze animaux qui restent sont conservés comme témoins. Toutes précautions sont prises pour qu'ils soient soustraits à des contaminations accidentelles.

Parmi les quinze témoins, abattus après trois, six, douze mois, treize sont absolument sains. Les deux autres présentent sur l'uretère gauche un noyau de petit volume contenant quelques parasites adultes. Ces deux sujets ont été vraisemblablement contaminés avant leur isolement. Mais leurs lésions légères contrastent avec l'importance des kystes volumineux dus à l'infection expérimentale.

C. — Pénétration par la voie digestive.

Sur les six porcelets du premier groupe, deux sont sacrifiés un mois après l'ingestion. Reins et uretères sont indemnes. Le foie présente des lésions au début. Les quatre autres succombent de quatre-vingt-dix à cent jours après les repas infectants. Ils sont porteurs de lésions hépatiques massives. Les reins et les uretères sont absolument sains. Les caractéristiques

macroscopiques sont les mêmes que dans la maladie naturelle. Elles ont été décrites plus haut.

Au point de vue microscopique, les lésions portent d'abord sur le parenchyme. Le lobule est le siège d'une hémorragie qui infiltre la masse des cellules hépatiques. Dans les lobules les moins atteints, on aperçoit encore une bande de cellules saines sur le pourtour des travées conjonctives qui limitent le lobule. Parfois l'extravasation sanguine intéresse plusieurs lobules en même temps. Dans l'intérieur de certains d'entre eux se trouve un parasite jeune, dont la plus grande circonférence a un diamètre de 350 à 400 μ. La veine centrale du lobule n'est plus visible. Les canalicules biliaires, les vaisseaux portes, les veines sus-hépatiques, l'artère hépatique sont sains (Planche XIV, fig. 1).

A un stade plus avancé, d'une part le tissu conjonctif se substitue progressivement au parenchyme intralobulaire, d'autre part la gaine conjonctive qui entoure le lobule s'infiltre de cellules conjonctives embryonnaires. Les deux processus évoluent parallèlement, tendant à transformer le parenchyme du lobule autour du parasite en une loge fibreuse dans laquelle le parasite sera enfermé, et à épaissir les travées conjonctives périlobulaires des lobules voisins. Dans les espaces de Kiernan, les veines et les canalicules biliaires sont entourés de cellules embryonnaires. Mais leurs tuniques restent indemnes et leur épithélium est intact. Au contraire, ces mêmes cellules infiltrent les veines sus-hépatiques. L'endothélium tombe, s'épaissit par la pénétration de leucocytes et de cellules conjonctives hyperplasiées qui oblitèrent la lumière du vaisseau. L'épaississement inflammatoire s'étend aux tuniques du vaisseau, qui sont dissociées.

Dans quelques lobules, des travées conjonctives partent de la veine centrale pour aboutir à la gaine périlobulaire. Les noyaux des cellules conjonctives, moins nombreux dans ces travées autour de la veine centrale, semblent indiquer que sur ce point le tissu de néoformation est plus ancien et que, par suite, ce vaisseau a été le point de départ de la prolifération conjonctive.

Le tissu fibreux prend donc à la fois les dispositions annulaire et intralobulaire. Peu à peu la cirrhose gagne les lobules

voisins. Le parenchyme et les vaisseaux disparaissent dans la masse compacte des fibres conjonctives. Des nodules embryonnaires apparaissent dans les espaces portes. Au centre des régions hépatiques le plus profondément altérées, on trouve dans la masse du tissu sclérosé, où persistent à peine quelques îlots de cellules hépatiques, des *Stephanurus* incomplètement évolués, isolés les uns des autres, dans d'étroites loges fibreuses.

Le foie, augmenté de volume, est donc atteint de cirrhose hypertrophique due aux actions mécanique, irritative et toxique exercées par le parasite (Planche XIV, fig. 2).

L'examen clinique et l'étude des lésions macroscopiques et microscopiques nous permettent de donner une interprétation des faits observés : la larve du *Stephanurus*, qui a passé par le tube digestif et la veine porte, a suivi les ramifications des vaisseaux portes jusqu'à leur terminaison soit dans les capillaires des lobules hépatiques, soit dans la veine centrale. Arrêtée, peut-être mécaniquement, par le calibre de ces petits vaisseaux, elle a pénétré activement dans le parenchyme lui-même, où elle a évolué vers l'état adulte. Les réactions qu'elle provoque dans la glande hépatique ont immobilisé le parasite, l'ont isolé et le condamnent à disparaître dans le tissu conjonctif envahissant, si l'animal parasité résiste longtemps à l'infection, à mourir avec son hôte, si celui-ci succombe.

La localisation du *Stéphanurus dentatus* dans le foie compromet donc la vie du porc et ne permet dans aucun cas la conservation de l'espèce du parasite.

D. — Pénétration par la voie cutanée.

Deux porcelets du second groupe sont abattus après deux mois d'observation. Ils n'ont pas de lésions hépatiques, mais leur uretère gauche est parasité. Les sept survivants se développent normalement. Ils sont sacrifiés onze et douze mois après les essais d'infection. Aucun d'eux n'a de lésions du foie. Tous sont porteurs de lésions massives périrénales et péri-urétérales.

A la suite de badigeonnages répétés de culture de larves, la peau, dont les poils ont été coupés et non rasés, présente des papules saillantes analogues aux formes connues de l'anky-

lostomose cutanée (fig. 2, ci-dessous). Ces papules s'affaissent et disparaissent sans avoir pris l'aspect pustuleux. Des témoins

Fig. 2. — Papules cutanées saillantes à la suite de badigeonnages répétés de cultures de larves, sur un porcelet.

badigeonnés avec un mélange d'urine et de noir animal, conservé dans les mêmes conditions que les cultures de larves, ne présentent aucune réaction de la peau.

Les ganglions inguinaux, correspondant à la région où les

larves ont été appliquées, s'hypertrophient. Ils peuvent atteindre le volume d'une amande. Ils reprennent très lentement leur volume normal sans aboutir dans aucun cas à la suppuration. Très rarement une certaine induration ganglionnaire a persisté.

La centrifugation de 10 cent. cubes de sang, prélevés par ponction du cœur toutes les demi-heures pendant les trois premières heures après le dépôt de cultures très riches sur la peau, ne nous a pas permis de constater la présence de larves dans la circulation générale.

Nous n'avons pas pu reprendre toutes les expériences de Looss sur les modes de pénétration des larves à travers la peau, sur leur passage dans les vaisseaux lymphatiques et sanguins et dans le canal thoracique, sur les larves égarées dans les divers tissus. Nous nous sommes bornés à faire la preuve de la pénétration cutanée en montrant, par l'examen microscopique, la présence des larves dans les couches profondes de la peau, dans les ganglions lymphatiques correspondant à la surface cutanée badigeonnée, et en déterminant les lésions macroscopiques et microscopiques des viscères.

Les biopsies pour l'examen microscopique de la peau sont faites de trois minutes à quatre heures après l'application des larves. Dans aucun cas, sur un très grand nombre de coupes en série, les larves ne se trouvent dans l'épiderme, le derme, les follicules pileux, les canalicules glandulaires. Elles ont atteint, au moment de la fixation de la pièce, la première couche musculaire au-dessous du tissu cellulaire sous-cutané (Planche XIV, fig. 3). Les diverses couches de la peau ne présentent aucune réaction inflammatoire. Il est donc vraisemblable d'admettre que la pénétration est extrêmement rapide et que les larves ne subissent aucun arrêt dans cette première étape de leur parcours. Looss est même d'avis qu'elles passent immédiatement dans le système lymphatique et que les larves retrouvées dans les couches profondes de la peau sont des larves égarées.

Dans les ganglions, au contraire, elles apparaissent dans la substance folliculaire, au centre d'une zone infiltrée de nombreux leucocytes éosinophiles. Sur des préparations colorées à l'hématéine-éosine, ce sont les amas diffus de leucocytes colorés en rose qui appellent l'attention sur la présence des parasites (Planche XIV, fig. 4). Les larves égarées dans les ganglions sont

susceptibles d'y subir une première transformation et d'augmenter sensiblement de volume. Elles provoquent alors une hypertrophie persistante de l'organe.

Les lésions macroscopiques de l'uretère et des reins des animaux soumis à l'expérimentation sont en tous points identiques aux lésions de la maladie naturelle. Nous les avons décrites plus haut.

A l'examen microscopique, l'uretère normal du porc revêt, sur une coupe transversale, l'aspect d'un canal dont la lumière est étoilée. Les parois sont constituées par une muqueuse plissée dont le chorion, hérissé de huit saillies papilliformes, supporte un épithélium pavimenteux stratifié formé de huit assises cellulaires; par une musculeuse, en faisceaux discontinus et par une adventice conjonctivo-élastique et adipeuse. Le diamètre total du canal et de ses parois est de 5 millimètres dans son tiers supérieur et de 2 à 3 dans sa partie inférieure. Chez les animaux sains, l'uretère est appliqué en arrière sur le muscle psoas; il est dissimulé par une couche de graisse tendue sur le muscle sous-jacent.

Nous avons vu que les kystes péri-urétéraux où se trouvent les *Stephanurus* constituent une masse volumineuse en saillie mamelonnée sur la paroi musculaire; une coupe transversale dans cette masse a un diamètre de 2 à 4 centimètres environ. Le contour est irrégulièrement arrondi en ovale. Sur une préparation colorée, on aperçoit, à un faible grossissement, l'uretère situé dans l'épaisseur de la tumeur, en un point qui n'est pas exactement central. A quelques millimètres de l'uretère, au milieu du tissu conjonctif, se trouvent des cavités kystiques de forme irrégulièrement arrondie ou ovalaire. Sur une coupe perpendiculaire à l'axe longitudinal du kyste, la cavité arrondie, avec un léger étranglement médian, mesure de 2 à 3 millimètres dans ses divers diamètres. Elle contient deux parasites de dimensions inégales, coupés perpendiculairement à leur axe longitudinal (Planche XIV, fig. 5). Celui dont la circonférence est la plus large, la femelle, mesure de $2^{mm}400$ à $1^{mm}600$ sur ses divers diamètres; l'utérus est plein d'œufs. Le plus petit, le mâle, a des diamètres variant entre 800 μ et 1.600 μ. Parfois la coupe intéresse un seul des parasites dans le sens longitudinal au milieu d'une cavité d'un ovale très

allongé. Dans tous les cas, les parois du kyste suivent exactement le contour des parasites qu'ils contiennent. Les incidences diverses des kystes, sur une même coupe transversale, indiquent que leurs axes ne sont pas toujours parallèles à l'axe de l'uretère. On peut en compter une dizaine sur un même plan. Sur certaines coupes, un canalicule de 300 μ de largeur environ s'ouvre à une de ses extrémités dans l'uretère et de l'autre dans une cavité kystique, après un parcours faiblement sinueux. Cette première observation confirme les données de l'examen macroscopique.

A un grossissement de 250 diamètres, la lumière de l'uretère conserve son aspect normal. Les plis de la muqueuse sont au nombre de huit. Les saillies du chorion sont intactes. Au niveau de l'abouchement des canalicules, l'épithélium disparaît. Mais le canal conserve son calibre. Même dans les cas de parasitisme intense, aucun phénomène de sclérose oblitérante ne menace la perméabilité de l'uretère. Les couches de la musculeuse sont dissociées par l'infiltration et la prolifération conjonctives. Il en est de même pour les fibres conjonctivo-élastiques de l'adventice. Les parois des cavités où se trouvent les parasites et des canalicules sont constituées par du tissu conjonctif dense. Tous ces éléments différenciés sont englobés par de nombreux vaisseaux. Dans les tumeurs très anciennes, certaines cavités sont oblitérées par des débris de parasites, de leucocytes dégénérés. Dans toute l'épaisseur de la tumeur, les éosinophiles sont extrêmement nombreux.

Les parasites provoquent dans l'atmosphère cellulo-graisseuse du rein des lésions comparables à celles de l'uretère. Dans le cas d'infection très accentuée, cette enveloppe est transformée en vastes cavités contenant des parasites, des débris cellulaires et une substance crémeuse verdâtre. Le tissu conjonctif périnéphrétique est infiltré de cellules embryonnaires et de leucocytes éosinophiles. Mais l'enveloppe fibreuse qui sépare l'atmosphère graisseuse du tissu propre n'est pas dissociée (Planche XIV, fig. 6). Elle présente seulement quelques zones inflammatoires. Au contact de ces zones, la glande est le siège d'une prolifération conjonctive qui détruit quelques glomérules et les tubuli avoisinants. Ces lésions de néphrite interstitielle, légères dans les cas d'infection périrénale les plus

accentués, sont si nettement localisées que la fonction du rein ne peut pas s'en ressentir sensiblement.

Il résulte donc de l'examen clinique et des recherches expérimentales que la pénétration cutanée des larves, prouvée par leur présence dans le derme et la substance folliculaire des ganglions, a pour conséquence la formation de kystes péri-urétéraux où se fait l'accouplement des adultes. Par les canalicules qui relient les kystes au canal de l'uretère, les œufs passent dans la vessie et sont expulsés au dehors. Les kystes qui se constituent autour des uretères et des reins n'entraînent pas l'oblitération du canal de l'uretère et la destruction du parenchyme rénal. Les lésions qui intéressent les reins et les uretères permettent aux parasites de se reproduire et de répandre leurs œufs dans le milieu extérieur ; elles n'entravent pas le développement de leur hôte.

E. — Faits confirmatifs.

Nous aurions voulu réaliser une confirmation des faits que nous venons d'exposer en renouvelant nos expériences sur un nombre plus considérable d'animaux. Nous aurions alors fixé avec plus de précision la progression des lésions depuis la pénétration des larves jusqu'à l'état adulte des *Stephanurus*. Notre séjour limité en Annam ne nous a pas permis de reprendre un travail d'aussi longue durée. Cependant le nombre relativement faible des sujets soumis à l'expérimentation est compensé par la constance des résultats enregistrés. La spécificité des lésions obtenues avec chacune des voies de pénétration est d'autant mieux démontrée que nous avons toujours pratiqué des infections massives, favorables à la généralisation des parasites, si elle avait dû se produire.

Les résultats expérimentaux expliquent les données en apparence contradictoires de l'observation de la maladie naturelle dans les diverses parties du monde. Les localisations du parasite dans le foie sont liées aux conditions d'élevage qui favorisent la pénétration par la voie buccale.

En Annam, les porcs sont enfermés dans des boxes étroits où ils sont constamment vautrés sur le sol dans la boue souillée de leurs excreta. La nourriture leur est portée dans des baquets

spéciaux. La putréfaction fait disparaître un grand nombre de larves de *Stephanurus*. Les porcs ne cherchent pas à fouiller dans leurs propres déjections. Par contre, ils présentent la plus grande partie de leur surface cutanée à la pénétration des larves qui survivent dans ce sol humide et chaud. Au moment de mettre bas, les truies sont isolées dans des boxes plus secs où les jeunes restent parqués pendant quelques semaines. 34,6 p. 100 des adultes sont atteints de stéphanurose ; parmi eux, 100 p. 100 ont des lésions péri-urétérales, 4 p. 100 seulement des lésions hépatiques légères.

Au Dahomey, d'après Pécaud [10], les porcs errent en liberté. Au bout de deux ou trois jours, les jeunes courent avec la mère et fouillent le sol. Les œufs éliminés avec les urines sont répandus de tous côtés sur la terre, particulièrement dans les endroits où les porcs reviennent régulièrement pour chercher des détritus alimentaires. Les chances de contamination buccale sont aussi nombreuses que les possibilités de pénétration cutanée. Sur le plateau d'Abomey, Pécaud n'a pas trouvé un seul porc indemne parmi 2.000 animaux examinés. Les uretères, les reins et le foie étaient toujours simultanément atteints. Mais cet auteur constate que : 1° les parasites trouvés dans le foie sont ou embryonnaires ou jeunes (Johnston [4] avait fait la même observation en Australie) ; 2° les nématodes des kystes péri-urétéraux sont toujours par couple ; les ovaires des femelles sont bourrés d'œufs ; 3° les kystes et canaux s'ouvrent fréquemment dans le canal de l'uretère. Et dans l'urine, on retrouve constamment des quantités d'œufs et même d'embryons libres.

Ces observations, faites au Dahomey, dans des conditions de milieu tout à fait différentes de celles qui se sont présentées à nous en Annam, sur une forme de stéphanurose cliniquement différenciée, apportent une confirmation nouvelle des faits que nous avons exposés.

IV. — CONCLUSIONS

Il résulte de l'ensemble de nos recherches que le *Stephanurus* peut pénétrer dans l'organisme du porc : 1° par la voie cutanée ; 2° par la voie digestive, et que des lésions spécifiques correspondent à chacun de ces modes de pénétration : kystes péri-

rénaux et péri-urétéraux pour le premier, cirrhose hypertrophique du foie pour le second. L'observation de la maladie naturelle et l'expérimentation établissent nettement que la localisation péri-urétérale du *Stephanurus* fait partie du cycle évolutif de ce nématode.

Depuis les travaux de Looss et des expérimentateurs qui ont contrôlé ses recherches, la pénétration cutanée est considérée comme un phénomène d'ordre général dont les cas particuliers connus deviennent de plus en plus nombreux. La démonstration de l'importance relative de ce mode d'infection et de la pénétration buccale était difficile à réaliser en utilisant comme matériel d'expérimentation les ankylostomes dont l'intestin grêle est le seul habitat. Les localisations si nettement différenciées du *Stephanurus dentatus*, selon son mode de pénétration, montrent que les larves suivent aussi facilement la voie buccale que la voie cutanée pour infecter leur hôte. La fréquence de chacun de ces modes d'accès est sous la dépendance des influences du milieu dans lequel vivent les animaux réceptifs et les larves du nématode. Mais la pénétration buccale est un accident qui entraîne la disparition du parasite. La pénétration cutanée est seule compatible avec la conservation de l'espèce. La connaissance plus étendue des conditions biologiques des vers parasites montrera si le cycle évolutif propre au *Stephanurus dentatus* doit être considéré comme un cas particulier d'une loi générale.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. Calmette et M. Breton (1). — *Bull. Acad. Méd.*, 21 mars 1905.
Calmette et M. Breton (2). — *L'Ankylostomiase*, Paris, 1905.
2. K. M. Diesing. — *Annalen Wien. Mus.*, II, 1839, p. 219-242.
3. Z. Hellmans. — *Centralblatt f. Bakt.*, I Or., 1911, t. LVII, p. 212-235.
4. T. H. Johnston. — *Notes sur quelques anthozoaires*, 1912, p. 88-89.
5. Katsurada et Hashegawa. — *Centralblatt f. Bakt.*, I Or., fév. 1910, t. LIII.
7. Leichtenstern. — *Centralblatt f. klin. Med.*, 1886, n° 39.
8. A. Looss (1). — *Centralblatt f. Bakt.*, I Or., t. XXIV, n° 13, 1898.
A. Looss (2). — *Records of the school of medicine.* Cairo, 1911, vol. IV. Cet ouvrage contient une bibliographie complète sur la pénétration cutanée et buccale des larves de nématode jusqu'en 1910.
9. V. Marzocchi. — *Giorn. R. Acc. Med. Torino*, t. LXX, f. 1-2, p. 3-14, 1907.
10. M.-G. Pécaud. — *Supplément au Journal officiel de l'Afrique occidentale française.* Rapports et documents, année 1912.
11. A. Railliet (8). — *Traité de zoologie médicale et agricole*, 1895.
12. A. Railliet et A. Henry. — *Bull. Soc. Path. exotique*, 1911, p. 695.
13. Louise Tayler. — *Sixteenth Annual report bureau of animal industry.* U. S. dep. of agriculture, Washington, 1900, p. 613-637. Ce travail contient la bibliographie du *Stephanurus dentatus* jusqu'en 1899.
14. P. Van Durme. — *Thompson Yates Laboratories*, Liverpool, t. VI-II, p. 471, 1902.
15. Yonegi Miyagawa. — *Centralblatt f. Bakt.*, I Or., t. LXVIII, 1913.

EXPLICATION DES FIGURES DE LA PLANCHE

Fig. 1. — Réaction conjonctive du tissu hépatique au début du développement du *Stephanurus dentatus* dans le foie; *a*, parasite. — Gr. : 120 d. Coloration : hématéine-éosine-safran (P. Masson).

Fig. 2. — Terme du processus cirrhotique : le parasite est isolé dans une loge fibreuse ; *a*, parasite, *b*, vestige du tissu hépatique. — Gr. : 60 d. Coloration : hématéine-éosine-orange.

Fig. 3. — Larves dans la couche musculaire sous-dermique. — Gr. : 700 d. Coloration : hématéine-éosine.

Fig. 4. — Larve immobilisée dans un ganglion inguinal. — Gr. : 180 d. Coloration : hématéine-éosine.

Fig. 5. — Coupe transversale d'une tumeur péri-urétérale, montrant l'uretère *a*, deux kystes *b*, contenant des parasites mâle et femelle, un kyste *c* contenant un parasite sectionné à une faible distance de l'extrémité buccale, des fragments de canalicules *d* faisant communiquer les kystes avec la lumière de l'uretère. — Gr. : 12 a. Coloration : hématéine-éosine-safran (P. Masson).

Fig. 6. — Coupe longitudinale du rein, montrant les lésions périrénales *a* et l'intégrité du parenchyme rénal *b*.

RECHERCHES BIOLOGIQUES SUR L'ÉOSINOPHILIE

par M. WEINBERG et P. SÉGUIN.

PREMIER MÉMOIRE

(Avec les planches XV et XVI.)

Par sa classification des globules blancs, Ehrlich a établi l'indépendance morphologique des éosinophiles. Mais bien que ces cellules constituent une variété leucocytaire distincte, nous ignorons encore quelles sont leurs propriétés physiologiques et si leur différenciation morphologique correspond à une fonction biologique spéciale.

Les travaux publiés sur les éosinophiles se rapportent presque exclusivement à l'éosinophilie sanguine. Ainsi, les cliniciens ont étudié, avec beaucoup de soin, toutes les conditions dans lesquelles cette éosinophilie apparaît chez les malades et ont précisé la valeur diagnostique de ce symptôme. D'autre part, les recherches expérimentales ont permis de comprendre le mécanisme de la production de l'éosinophilie. Nous savons qu'un grand nombre de substances toxiques, surtout celles d'origine parasitaire, une fois résorbées par l'organisme, agissent sur les centres hématopoiétiques, et spécialement sur la moelle osseuse : ces organes réagissent par une surproduction de cellules éosinophiles dont un grand nombre passent dans le torrent circulatoire.

Mais, comme nous venons de l'indiquer plus haut, nous n'avons que des hypothèses sur le rôle biologique probable de l'éosinophile. Il existe cependant un fait qui permet de penser que les éosinophiles jouent un rôle dans l'immunité : c'est la formation de l'éosinophilie locale qu'on observe dans un grand nombre de lésions toxiques ou parasitaires.

Une étude complète de l'éosinophilie locale était indispensable, parce qu'elle devait amener à déterminer les conditions qui mettent en évidence les propriétés chimiotactiques de l'éosinophile, mais aussi, et surtout, parce que c'était le seul moyen de trouver un procédé de rassembler en un point de l'organisme

une quantité considérable de cellules éosinophiles. Les éosinophiles, isolés pour ainsi dire à l'état pur, c'est-à-dire non associés à d'autres éléments du sang, il deviendrait alors possible de les recueillir et d'en étudier les propriétés biologiques, non seulement *in vivo*, mais aussi *in vitro*.

Ce premier mémoire résume nos recherches sur l'éosinophilie locale, provoquée chez les animaux neufs ou immunisés avec des substances éosinotactiques. Nous avons été amenés également à étudier le rapport des éosinophilies locale et sanguine avec l'anaphylaxie. Ces observations constituent la troisième partie de ce travail.

L'étude des propriétés phagocytaires des éosinophiles sera exposée dans un deuxième mémoire.

I. — ÉOSINOPHILIE LOCALE EXPÉRIMENTALE

Nous avons choisi, comme premier matériel d'étude, les paupières de chevaux instillés dans l'œil avec quelques gouttes du liquide péri-entérique de l'*Ascaris megalocephala*. Cette instillation provoque, en effet, dans le tissu conjonctif de la paupière, à côté d'un œdème plus ou moins intense, un afflux leucocytaire toujours marqué, et caractérisé spécialement par la présence de polynucléaires éosinophiles. Les éosinophiles du cheval sont, de plus, très faciles à étudier sur les coupes, les grosses granulations qui remplissent ces cellules ne permettant aucune erreur d'interprétation.

Nous avons réséqué les paupières un quart d'heure, une demi-heure, une heure et jusqu'à quatre-vingt-seize heures après l'instillation dans l'œil de liquide ascaridien, pour pouvoir suivre toutes les phases de l'éosinophilie locale (1).

Dans la première heure qui suit l'instillation, les capillaires du chorion de la muqueuse palpébrable sont bourrés de polynucléaires de toute nature, neutrophiles, éosinophiles et mastzellen. Le taux de cette polynucléose oscille entre 94 et 96 p. 100. Dans les réactions plus légères, l'afflux leucocytaire est moins marqué, mais la polynucléose est toujours aussi élevée. Notons

(1) Les pièces ont été fixées par le liquide de Bouin, incluses dans la paraffine et les coupes colorées par l'hématine-éosine dilué, le Giemsa, le bleu de toluidine-éosine-orange, etc...

que la paupière de l'œil témoin reste absolument indemne. On constate une très grande variation dans le nombre relatif des différentes formes de leucocytes granuleux attirés dans les capillaires sanguins. Dans certains cas, l'éosinophilie capillaire est très forte (de 50-64 p. 100); dans d'autres paupières elle est moyenne, faible ou nulle. Comme nous avons rencontré ces formules leucocytaires chez des chevaux appartenant à une même série d'expériences, c'est-à-dire traités par la même toxine employée à la même dose, nous nous sommes demandé si ces résultats ne pouvaient pas s'expliquer par la teneur variable du sang circulant en éosinophiles. Nous avons alors refait nos expériences, en établissant chez tous nos chevaux à la fois la formule leucocytaire du sang général et celle du sang des capillairés de la paupière malade (1).

Tableau I.

RÉACTIONS DE DÉBUT				
NUMÉROS des chevaux.	DURÉE de l'expérience.	POURCENTAGE DES ÉOSINOPHILES		
		Sang.	Capillaires.	Tissu conjonctif.
E 2	20 min.	0 »	0	Pas d'éosinophiles dans la plupart des cas.
E 3	30 min.	0 »	2	
F 15	20 min.	0,5	7	
F 18	40 min.	1 »	16	
E 7	40 min.	1,5	13	
E 5	30 min.	1,5	20	
C 7	20 min.	2 »	21	
C 3	20 min.	2 »	30	
E 9	50 min.	3 »	20	
E 1	15 min.	3 »	26	
E 6	30 min.	4 »	20	
E 10	50 min.	4 »	30	
C 2	15 min.	4 »	51	
F 11	15 min.	5 »	39	
F 20	50 min.	5 »	54	
C 4	20 min.	7 »	57	
C 6	20 min.	8 »	50	
F 13	20 min.	12 »	67	

Le tableau ci-dessus, qui résume nos observations dans les

(1) Ces formules leucocytaires ont été établies en comptant 300 leucocytes. Les frottis de sang ont été colorés par la méthode de Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa).

cas où la réaction locale était nette, montre qu'au début de la réaction, l'intensité de l'éosinophilie locale est en rapport direct avec l'éosinophilie sanguine. Nous avons constaté que, d'une part, l'on ne rencontre d'éosinophiles dans les capillaires de la paupière que dans les cas où les éosinophiles existent dans le sang général et que, d'autre part, le taux des éosinophiles attirés localement dans les capillaires est directement proportionnel à celui des éosinophiles du sang périphérique.

Ce rapport étroit, que l'on constate entre la formule sanguine dans les capillaires et la formule leucocytaire du sang périphérique, est encore confirmé par la relation existant entre le nombre des mastleucocytes du sang et celui des mastleucocytes attirés dans les vaisseaux de la paupière instillée. En voici quelques exemples :

NUMÉROS DES CHEVAUX	MASTZELLEN dans le sang.	MASTZELLEN dans les capillaires.
E 2	0 p. 100	0 p. 100
E 7	0 —	0 —
E 3	0 —	2 —
E 6	0 —	2 —
E 10	0 —	3 —
E 5	0,5 —	6 —
E 9	1 —	8 —
E 1	2 —	12 —

La formule leucocytaire établie dans les capillaires dans la première heure qui suit l'instillation est donc une image déformée de la formule leucocytaire du sang périphérique, et ceci, quelles que soient l'intensité de la réaction et la dilution de toxine employée (pure, diluée au 1/400 ou au 1/500).

L'action chimiotactique toute spéciale qu'exerce la toxine ascaridienne sur les éosinophiles du sang est encore démontrée par les faits suivants :

Dans le premier quart d'heure qui suit l'instillation, on ne constate pas encore d'infiltration diapédétique dans le tissu conjonctif de la muqueuse palpébrale. Les leucocytes granuleux sont entassés dans les capillaires (Pl. XV, fig. 1). Mais déjà, sur les pièces réséquées un peu plus tardivement, au bout d'une demi-heure par exemple, on voit les éosinophiles traverser par diapédèse les parois vasculaires, s'insinuer entre les cellules

périthéliales qu'ils dissocient, et sortir ainsi les premiers des vaisseaux avant les autres variétés de leucocytes (Pl. XV, fig. 2). Sur des pièces récoltées plus tardivement encore (une heure à deux heures après l'instillation), les éosinophiles sont disséminés dans le tissu conjonctif et souvent serrés autour des vaisseaux auxquels ils constituent comme une gaine protectrice (Pl. XV, fig. 3). Notons que plus les paupières sont réséquées longtemps après l'instillation, plus le taux de la polynucléose et, par conséquent, de l'éosinophilie tend à diminuer dans les capillaires. Voici, à titre d'exemple, quelques formules leucocytaires établies dans les capillaires du chorion de la muqueuse palpébrale, deux heures environ après l'instillation de la toxine ascaridienne. On voit qu'à ce stade, la polynucléose n'oscille plus qu'entre 73 et 80 p. 100.

NUMÉROS des chevaux.	FORMULE LEUCOCYTAIRE DANS LES CAPILLAIRES			
	POLYNUCLÉAIRES			LYMPHOCYTES et MONONUCLÉAIRES
	Neutrophiles.	Mastzellen.	Eosinophiles.	
A 5.	70	2	1	27
G 6.	70	1	5	24
A 6.	65	7	7	21
B 1.	56	1	23	20

La réaction chimiotactique, intense au début, s'atténue très rapidement; nous expliquons ce fait par la diffusion rapide de la toxine dans l'organisme du cheval.

On doit en conclure que le maximum de l'éosinophilie locale dans le tissu conjonctif est réalisé quelques heures après l'instillation. Plus il y aura d'éosinophiles dans le sang, plus l'éosinophilie locale sera intense dans le tissu conjonctif.

Le tableau II est particulièrement instructif à cet égard. Nous constatons que dans les paupières réséquées sept heures après l'instillation, l'abondance des éosinophiles dans le tissu conjonctif est rigoureusement proportionnelle à l'abondance des éosinophiles dans le sang périphérique. Dans deux cas sur trois où l'éosinophilie sanguine était nulle, le tissu conjonctif ne renferme pas d'éosinophiles, alors qu'on y remarque une infil-

tration diapédétique très intense d'autres variétés leucocytaires. Au maximum de l'éosinophilie sanguine correspond l'éosinophilie maxima dans le tissu conjonctif. Ces éosinophiles ont tous les caractères morphologiques des éosinophiles du sang. L'étude cytologique attentive de ces éléments nous permet de rejeter l'hypothèse de la formation locale des éosinophiles dans l'éosinophilie conjonctive expérimentale. Ajoutons enfin qu'à ce stade, les polynucléaires ont cessé d'affluer dans les capillaires; les éosinophiles y atteignent à peine le taux établi dans le sang périphérique; on y constate, par contre, une mononucléose atteignant souvent 60 p. 100.

Tableau II.

RÉACTIONS DE 7 HEURES			
NUMÉROS des chevaux.	POURCENTAGE des éosinophiles :		NOMBRE DE CELLULES éosinophiles par 10 champs microscopiques
	Sang.	Capillaires.	Tissu conjonctif.
I 3	0 »	0	0
I 9	0 »	0	0
I 6	0 »	0	30
I 7	0,3	0	4
I 10.	0,3	0	16
I 8	1 »	2	28
I 4	1,3	2	30
I 5	3 »	4	70
I 2	8 »	4	130

L'étude des paupières réséquées plus tardivement encore nous montre la réparation des lésions produites par la toxine ascaridienne.

L'œdème est en général résorbé ; les leucocytes sont bien moins nombreux dans les capillaires, les mononucléaires atteignant toujours un pourcentage élevé. Les éosinophiles persistent longtemps dans le tissu conjonctif. Suivant que la lésion est à un stade plus ou moins avancé de réparation, l'on constate :

a) Dans le cas où la réaction a été très forte, l'œdème n'est pas toujours entièrement résorbé après douze à vingt-quatre heures. Les éosinophiles dominent mêlés aux autres polynu-

cléaires et à de nombreux mononucléaires, lymphocytes, grands monucléaires et plasmazellen.

b) Dans les cas où la réaction a été moins intense, où lorsque les paupières ont été réséquées plus tardivement encore (au bout de 60 à 96 heures), les lésions en voie de réparation se présentent avec les caratères suivants : les éosinophiles sont écrasés entre les fibres conjonctives qui les enserrent. Presque tous sont en pycnose. On en voit souvent d'englobés par de grands macrophages. Notons l'augmentation notable des mastzellen histiogènes qu'il n'est pas rare de rencontrer en mitose.

Nous avons pu reproduire des lésions tout à fait semblables chez les cobayes en injectant à ces animaux sous la peau de l'abdomen ou dans les muscles de la cuisse d'autres produits vermineux.

Le tableau III résume quelques-unes de nos nombreuses observations qui prouvent que l'injection de liquide hydatique ou d'extrait aqueux de sclérostome filtré sur Chamberland, provoque dans le tissu conjonctif sous-cutané ou intermusculaire du cobaye une infiltration diapédétique, qui évolue exactement comme celle que l'on provoque dans la paupière des chevaux instillés dans l'œil avec la toxine ascaridienne.

Tableau III.

NUMÉROS des cobayes.	TOXINE injectée.	ÉOSINOPHILIE			REMARQUES
		Sanguine.	Dans les capillaires.	Conjonctive.	
		p. 100	p. 100		
34 B	5 c.c. liq. hyd.	0,3	2	Pas encore établie.	Inj. dans les muscles de la cuisse. Sacrifiés 1/2 h. après l'injection.
35 B	Id.	3 »	20		
36 B	Id.	11 »	40		
37 B	Id.	4 »	9	Nomb. éosinoph. dans le tissu conjonctif intermusculaire.	Inj. dans les muscles de la cuisse. Sacr. 3 h. après l'injection.
38 B	3 c.c. d'ex. sclérostomes.	4 »	7		
93 B	10 c.c. liq. hyd.	4 »	»	Nomb. éosinoph. dans le tissu conjonctif sous-cutané.	Injectés sous la peau. Sacrifiés 7 h. après l'injection.
65 C	Id.	11 »	»		
71 A	Id.	12 »	»		

Ainsi, que les expériences portent sur le tissu conjonctif de la paupière, sur le tissu conjonctif sous-cutané ou intermusculaire, la loi reste toujours la même : la résorption de toxines vermineuses détermine un afflux intense de leucocytes éosinophiles qui arrivent dans le tissu conjonctif en nombre d'autant plus considérable qu'ils sont plus abondants dans le sang circulant. Il est donc bien établi que l'éosinophilie locale provoquée expérimentalement s'alimente aux dépens des éosinophiles du sang.

Lorsque ceux-ci font défaut, ce sont les polynucléaires neutrophiles (ou pseudo-éosinophiles du cobaye) qui répondent à l'appel de la toxine injectée, ce qui montre que les substances « éosinotactiques » n'agissent pas uniquement, mais seulement de préférence (d'une façon plus intense) sur les éosinophiles du sang (Pl. XV, fig. 4).

Notons ici que Grosso (1) a cru pouvoir affirmer que l'extrait de sclérostome n'était pas éosinotactique et attirait seulement les polynucléaires pseudo-éosinophiles. Il contredit sur ce point les observations de Valillo (2) et celles de Panizza (3). Pour Grosso, seules les substances riches en albumines sont éosinotactiques. Nos observations nous permettent de penser que les résultats contradictoires obtenus par ces auteurs s'expliquent parce qu'ils ont utilisé dans leurs différentes expériences des cobayes ayant des formules leucocytaires différentes, dont le sang était tantôt pauvre, tantôt riche en éosinophiles.

Le maximum de l'éosinophilie locale est réalisé en quelques heures.

L'éosinophilie locale persiste encore longtemps après l'injection de produits vermineux. Cette persistance permet d'expliquer qu'on puisse la retrouver, alors même que l'éosinophilie sanguine aurait eu le temps de disparaître pour une cause quelconque. Si l'on n'avait pas suivi en pareil cas toutes les phases de l'évolution de l'éosinophilie locale, on aurait pu conclure à tort que celle-ci s'est installée aux dépens d'éléments

(1) Grosso. Die chimiotaktische Wirkung der Sclerostomen Extracten. *Folia Hæmat.*, 1912, B. XIV, H. 1, p. 18.

(2) Valillo. Die positive chem. Wirkung der Extracten von Sclerost. *Arch. f. wissensch. und prakt. Tierheitkunde*, Bd XXXIV.

(3) Panizza. Ricerche sull' origine dell' eosinof. *Clin. vet.* (Sez. prat.), p. 206 (d'après Grosso).

formés sur place. On comprend alors pourquoi quelques observateurs affirment que non seulement l'éosinophilie locale n'est pas en rapport avec l'éosinophilie sanguine, mais que c'est encore l'éosinophilie locale qui est la source des éosinophiles du sang.

Nous avons voulu vérifier si les lois établies pour l'éosinophilie locale provoquée expérimentalement dans le tissu conjonctif trouvaient leur application lorsque l'on injecte dans le péritoine des cobayes neufs des produits parasitaires. Mais avant de noter nos résultats, nous devons aborder la question de l'éosinophilie péritonéale spontanée que l'on rencontre fréquemment chez le cobaye, ainsi que l'avaient constaté Stäubli et Weidenreich (1).

Pour donner une idée de la fréquence de cette éosinophilie spontanée, notons que, sur 150 cobayes examinés (2), nous n'en avons trouvé que 7 à exsudat péritonéal dépourvu d'éosinophiles. Parmi les autres, chez 18 cobayes l'éosinophilie péritonéale dépassait 30 p. 100. Nous donnons ci-dessous les chiffres exacts.

Nos des cobayes	TAUX de l'éosinophilie péritonéale spontanée	Nos des cobayes	TAUX de l'éosinophilie péritonéale spontanée
49 E	32 p. 100	83 E	38 p. 100
2 H	33 —	50 H	39 —
58 D	33 —	54 H	40 —
69 E	35 —	92 E	40 —
19 H	35 —	36 E	42 —
11 H	35 —	18 H	44 —
84 E	37 —	47 H	46 —
92 H	37 —	4 H	57 —
65 H	38 —	17 L	65 —

Szecsi et Ewald (3), qui se sont occupés, en même temps que nous, de la question de l'éosinophilie péritonéale spontanée du cobaye, ont publié tout récemment des chiffres aussi élevés.

(1) On trouvera l'historique de cette question dans le travail de Szecsi : Experimentelle Studien über Serosa Exsudatzellen. *Folia Hæmat.*, vol. XIII, Fasc. 1, 1912, p. 1.

(2) Les frottis d'exsudat sont desséchés rapidement par agitation et colorés suivant la méthode de Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa) avec la modification suivante : Nous ne laissons les frottis que trois à quatre minutes dans la solution de Giemsa pour éviter la surcoloration.

(3) Szecsi et Ewald. Zur Kenntnis der Peritonealexsudatzellen des Meerschweinchens. *Folia Hæmat.*, Bd XVII, 1913, p. 167.

Nous avons voulu nous rendre compte si cette éosinophilie spontanée était en rapport avec l'éosinophilie sanguine. Le tableau IV résume ces observations.

Tableau IV.

Nos des cobayes	ÉOSINOPHILIE sanguine	ÉOSINOPHILIE péritonéale	Nos des cobayes	ÉOSINOPHILIE sanguine	ÉOSINOPHILIE péritonéale
—	—	—	—	—	—
65 A	0 p. 100	3 p. 100	23 M	1 p. 100	5 p. 100
83 M	0 —	1 —	33 M	2 —	10 —
80 M	0 —	30 —	92 D	2 —	3 —
89 M	0 —	7 —	83 M	3 —	15 —
93 M	0 —	0 —	28 M	4 —	16 —
72 D	0 —	2 —	96 D	4 —	22 —
80 D	0 —	0 —	86 A	7 —	33 —
89 D	0 —	0 —	84 D	8 —	24 —
93 D	0 —	5 —	83 D	9 —	28 —
70 D	1 —	0 —	98 D	10 —	25 —
76 D	1 —	10 —	77 D	11 —	42 —
79 D	1 —	4 —	64 A	21 —	21 —
95 D	1 —	2 —	17 L	20 —	65 —
99 D	1 —	0 —			

Il montre qu'en règle générale il existe un parallélisme entre l'intensité de ces deux phénomènes.

Nous ne pouvons cependant pas conclure que l'éosinophilie péritonéale spontanée s'alimente exclusivement aux dépens des éosinophiles du sang. Tous les auteurs qui ont étudié cette éosinophilie ont, en effet, constaté dans l'exsudat péritonéal du cobaye la présence d'une quantité plus ou moins considérable d'éosinophiles mononucléaires et de cellules à noyau incisé ou bilobé qui en dérivent. D'après les dernières recherches de Pappenheim (1), ces éléments proviendraient des taches laiteuses de l'épiploon.

Nous avons fréquemment rencontré ces cellules dans l'exsudat du cobaye, mais toujours en proportions variables, associées à des éosinophiles polynucléaires typiques ayant tous les caractères des éosinophiles du sang. Aussi ne doutons-nous pas que l'éosinophilie péritonéale spontanée ne s'alimente au moins partiellement aux dépens de l'éosinophilie sanguine.

Le parallélisme de l'éosinophilie péritonéale spontanée et de l'éosinophilie sanguine n'est donc pas pour nous une simple coïncidence. Si ces deux phénomènes sont quelquefois dis-

(1) Pappenheim. *Centralblatt f. Path. Anat.*, 30 nov. 1913, p. 997.

sociés, on peut facilement l'expliquer par la persistance très prolongée de l'éosinophilie péritonéale une fois établie. Ainsi, chez un de nos cobayes dont l'exsudat péritonéal renfermait, le 2 mai, 44 p. 100 de cellules éosinophiles et qui présentait une forte éosinophilie sanguine, nous avons encore compté 39 p. 100 d'éosinophiles dans le péritoine, le 5 novembre, c'est-à-dire six mois après le premier examen. A ce moment, l'éosinophilie sanguine était nulle.

Nous avons essayé de provoquer dans l'exsudat péritonéal du cobaye un afflux d'éosinophiles. Les formules leucocytaires du sang et de l'exsudat étaient soigneusement établies avant l'expérience. Nous avons injecté dans la cavité péritonéale du cobaye du liquide hydatique et de l'extrait aqueux de sclérostome, filtré sur Chamberland.

Les ponctions du péritoine ont été pratiquées, quatre heures, huit heures et vingt-quatre heures après l'injection. Dans ces conditions, il nous a été impossible de provoquer une éosinophilie péritonéale tant soit peu marquée, même chez les cobayes à forte éosinophilie sanguine.

Le tableau V indique exactement les conditions et les résultats de l'expérience.

En étudiant ce tableau, nous constatons que l'éosinophilie péritonéale, loin d'augmenter, diminue après l'injection. Cette diminution du taux des éosinophiles de l'exsudat n'est, à la vérité, qu'apparente. Elle est due à l'afflux, dans le péritoine, d'un nombre considérable de polynucléaires pseudo-éosinophiles du sang, ce qui fait baisser dans l'exsudat le nombre relatif des éosinophiles, pour le même nombre de cellules comptées.

Au bout de vingt-quatre heures, l'exsudat devient peu abondant, louche, riche en cellules ; on constate de nombreuses figures de phagocytose des polynucléaires par les macrophages, des monocytes en karyokinèse ; en même temps, le taux des éosinophiles tend à revenir au chiffre constaté avant l'injection. Nos expériences prouvent que l'injection d'une substance éosinotactique ne peut provoquer dans le péritoine ni éosinophilie, ni hausse de l'éosinophilie préexistante, même chez les cobayes à forte éosinophilie sanguine ; ce fait n'indique nullement que l'injection est restée sans action sur les éosinophiles du

Tableau V.

NUMÉROS des cobayes.	DOSES injectées.	ÉOSINOPHILIE sanguine.	ÉOSINOPHILIE péritonéale avant l'injection.	FORMULE LEUCOCYTAIRE DE L'EXSUDAT									REMARQUES
				4 HEURES après l'injection			8 HEURES après l'injection			24 HEURES après l'injection			
				Poly. pseudo-	Monoc.	Éosinop.	Poly. pseudo-	Monoc.	Éosinop.	Poly. pseudo-	Monoc.	Éosinop.	
1 C.	10 c.c. de liquide hydat.	10 p. 100	18 p. 100	»	»	»	74	18	8	»	»	»	Sacrifié.
3 C.		8 —	22 —	70	18	12	68	22	10	25	59	16	Sacrifié.
93	5 c.c. de liquide hydat.	0 —	0 —	»	»	»	68	32	0	»	»	»	Sacrifié.
94		4 —	5 —	65	33	2	70	30	0	»	»	»	
95		14 —	11 —	»	»	»	63	35	2	10	82	8	
89	2 c.c. d'extrait de scléro stome.	8 —	5 —	»	»	»	80	18	2	»	»	»	
48		10 —	2.5 —	»	»	»	82	18	0	»	»	»	
31		0 —	4 —	»	»	»	70	30	0	»	»	»	Sacrifié.
60		9 —	5 —	»	»	»	80	18	2	28	68	4	
90		3 —	0 —	»	»	»	83	17	0	»	»	»	

sang. En effet, l'examen histologique de la paroi abdominale et du mésentère des cobayes sacrifiés, huit heures et vingt-quatre heures après l'injection, montre l'existence, dans les tissus, d'une infiltration éosinophilique d'autant plus intense que le taux des éosinophiles du sang périphérique est plus élevé. Notre insuccès à provoquer l'afflux des éosinophiles du sang dans la cavité péritonéale n'implique pas que les lois de l'éosinophilie locale expérimentale ne peuvent pas trouver là encore leur application. Ces expériences montrent que les substances liquides injectées diffusent rapidement à travers la paroi abdominale où s'arrêtent les éosinophiles qu'elles attirent. L'éosinophilie locale s'établit dans ces conditions, non pas dans la cavité péritonéale, mais dans le tissu du voisinage.

Nous avons observé un certain nombre de faits qui ont trait à l'éosinophilie locale provoquée dans la muqueuse intestinale par la fixation de divers parasites dans le gros intestin du cheval. Ces observations d'éosinophilie locale parasitaire sont entièrement d'accord avec les lois que nous avons établies dans la partie expérimentale de notre travail. Le tableau VI est très démonstratif à cet égard. Il se rapporte à 12 chevaux dont nous avons examiné le sang quelques minutes après l'abatage, et chez lesquels nous avons trouvé de nombreux sclérostomes fixés sur la muqueuse du gros intestin.

Tableau VI.

NUMÉROS des chevaux.	ÉOSINOPHILIE sanguine.	ÉOSINOPHILIE locale.	NOMBRE de sclérostomes étudiés chez chaque cheval.	REMARQUES
8	0 p. 100	Nulle.	2	
18	2 —	Très faible.	3	
7	3 —	Faible.	3	
15	3 —	Faible.	2	
16	4 —	Peu marquée.	4. . . .	1 cas d'éosinophilie locale au début.
5	4 —	Nette.	6	
14	4 —	Nette.	1	
10	5 —	Nette.	1	
6	6 —	Nette.	2	
19	6 —	Intense.	1	
12	9 —	Nette.	7	
15	9 —	Très intense.	2. . . .	1 cas d'éosinophilie locale au début.

Le sclérostome s'attache sur l'intestin du cheval en aspirant, à l'intérieur de sa capsule buccale, qui fonctionne comme une ventouse, le chorion et la sous-muqueuse de l'intestin. C'est en pratiquant des coupes en série intéressant les boutons de fixation aspirés par les sclérostomes que nous avons étudié l'éosinophilie locale parasitaire.

Nous avons ainsi constaté l'existence d'une éosinophilie locale aux points de fixation des sclérostomes, dans l'intestin de tous les chevaux dont le sang était plus ou moins riche en éosinophiles.

Dans les cas où l'éosinophilie sanguine est nulle ou très faible, le bouton de fixation est surtout infiltré de polynucléaires neutrophiles. Lorsque l'éosinophilie locale est faible, les éosinophiles sont disséminés dans le chorion et la sous-muqueuse du bouton de fixation. Ces cellules ne se disposent en amas qu'au voisinage du pédicule du bouton de fixation, point d'élection de cette éosinophilie parasitaire. Quand l'éosinophilie locale est nette, on rencontre des amas d'éosinophiles dispersés de place en place dans le bouton de fixation. Dans les cas où l'éosinophilie est intense, les amas sont confluents (Pl. XVI, fig. 6).

Notons enfin que nous avons surpris le mécanisme de l'établissement de cette éosinophilie dans quelques cas où le parasite venait de se fixer sur la muqueuse. Ce stade est facile à reconnaître, le parasite n'ayant alors pas encore entamé l'épithélium de revêtement de la muqueuse dont il se nourrit, avant de sucer le sang de l'hôte. Dans ces conditions, nous avons observé plusieurs fois les éosinophiles tassés dans les capillaires dilatés et prêts à sortir des vaisseaux.

On peut reconnaître ici le premier stade de l'éosinophilie locale parasitaire tout à fait semblable au premier stade de l'éosinophilie locale expérimentale. Nous avons fait des observations analogues aux points de fixation de différents ténias du gros intestin du cheval.

II. — ÉOSINOPHILIE LOCALE PROVOQUÉE CHEZ LES COBAYES PRÉPARÉS PAR DES INJECTIONS RÉPÉTÉES

Après avoir étudié les lois de l'éosinophilie locale qui s'établit chez les cobayes neufs à la suite d'une injection de pro-

duits vermineux, nous avons voulu nous rendre compte de la façon dont se comportaient les éosinophiles, lors de l'immunisation provoquée par des injections répétées de substances éosinotactiques.

Nous avons fait deux séries d'expériences :

Tableau VII.

COBAYES PRÉPARÉS PAR DES INJECTIONS SOUS-CUTANÉES RÉPÉTÉES DE LIQUIDE HYDATIQUE				
Nos des cobayes	DOSES injectées sous la peau.	ÉOSINOPHILIE sanguine.	SACRIFIÉS après :	EXAMEN HISTOLOGIQUE
83	5 c.c.	28 p. 100	1/4 d'heure.	Éosinophilie locale dans les capillaires du derme, de l'hypoderme et du tissu conjonctif intermusculaire œdématiés.
41	5 c.c.	2 p. 100		
99	5 c.c.	12 p. 100	1 heure.	Éosinophilie locale en voie d'établissement, œdème.
64	10 c.c.	24 p. 100	7 heures.	Éosinophilie locale établie considérable; mononucléose dans les vaisseaux; œdème très étendu dissociant les faisceaux musculaires.
86	10 c.c.	8 p. 100		
COBAYES PRÉPARÉS PAR DES INJECTIONS INTRAPÉRITONÉALES RÉPÉTÉES D'EXTRAIT DE SCLÉROSTOME				
Nos des cobayes.	DOSES injectées sous la peau.	ÉOSINOPHILIE sanguine.	SACRIFIÉS après :	EXAMEN HISTOLOGIQUE
89	5 c.c.	12 p. 100	1/2 heure.	Éosinophilie locale intense en voie d'établissement dans le tissu sous-cutané et intermusculaire. Œdème.
90		8 p. 100	1 h. 1/2	

Dans la première, un lot de cobayes a été préparé par trois ou quatre injections sous-cutanées de 5 à 10 cent. cubes de liquide hydatique, espacées à huit jours d'intervalle. Une semaine après la dernière injection, on a injecté sous la peau de ces animaux 5-10 cent. cubes de liquide hydatique. Les cobayes ont été sacrifiés un quart d'heure, une heure, sept heures après l'injection. L'examen histologique a démontré

l'existence d'une éosinophilie locale très intense et très étendue, infiltrant non seulement le tissu cellulaire sous-cutané, mais aussi toute l'épaisseur du tissu conjonctif intermusculaire, jusqu'au péritoine. Tous ces cobayes accusaient au moment de l'injection une éosinophilie sanguine plus ou moins marquée.

Les cobayes du deuxième lot ont été préparés par 5 injections intrapéritonéales d'extrait aqueux de sclérostome, filtré sur Chamberland. Les animaux ont été sacrifiés une demi-heure et une heure et demie après une 6e injection de 5 cent. cubes d'extrait, pratiquée cette fois sous la peau. L'examen histologique de la peau et de la paroi abdominale a donné des résultats comparables à ceux cités plus haut. Ces observations sont résumées dans le tableau VII.

Dans la deuxième série d'expériences, les cobayes ont été préparés, soit par des injections sous-cutanées, soit par des injections intrapéritonéales. Mais, cette fois-ci, la dernière injection a été pratiquée dans le péritoine.

Cette expérience comporte trois lots de cobayes préparés soit par le liquide hydatique, soit par l'extrait aqueux de sclérostome, soit enfin par le sérum de cheval filtré sur Chamberland.

Nous avons consigné dans le tableau VIII les conditions et les résultats de ces expériences.

Il résulte de l'étude de ce tableau cette première notion que l'on ne peut provoquer d'éosinophilie péritonéale que chez les animaux en voie d'immunisation présentant avant l'injection une éosinophilie sanguine. De plus, alors que la première injection de substance éosinotactique ne provoque pas d'éosinophilie dans l'exsudat, même chez les cobayes à éosinophilie sanguine très marquée, les éosinophiles du sang arrivent au contraire en masse et très rapidement dans la cavité péritonéale, lorsque l'animal est préparé au moins par 2, et surtout par 3 ou 4 injections préalables, espacées à quelques jours d'intervalle.

La hausse de l'éosinophilie, déjà très nette quatre heures après l'injection, s'accentue encore après huit heures et persiste le lendemain. Si l'on suit la formule leucocytaire de l'exsudat,

TABLEAU VIII.

Cobayes préparés par des injections hebdomadaires de liquide hydatique pratiquées sous la peau.

NUMÉROS des cobayes	DOSES injectées dans le péritoine	EOSINOPHILIE sang.	EOSINOPHILIE périton. avant l'injection	FORMULES de l'exsudat 4 h. après l'injection			FORMULES de l'exsudat 8 h. après l'injection			FORMULES de l'exsudat 24 h. après l'injection			REMARQUES
				Pol. pseudo	Monoc.	Eos.	Pol pseudo	Monoc.	Eos.	Pol. pseudo	Monoc.	Eos.	
		p. 100	p. 100										
14 B	10 c. c.	20	**10**	28	22	**50**	»	»	»	»	»	»	A reçu 3 injections préparantes de 10 c.c. Sacrifié après 4 h., éosinophilie locale très intense dans le tissu conjonctif voisin, du mésentère et de la paroi abdominale.
62 M	10 c. c.	16	**12**	»	»	»	52	13	**35**	10	55	35	3 injections préparantes de 10 c.c.
8 I	10 c. c.	35	**0**	»	»	»	28	22	**50**	»	»	»	3 injections préparantes de 10 c.c.
95	5 c. c.	24	**8**	71	16	13	61	23	**16**	»	»	»	Ont reçu 2 injections préparantes de 5 c.c. 95, sacrifié après 8 h., éosinophilie locale comme précédemment, moins intense.
94	5 c. c.	20	**3**	»	»	»	57	28	**15**	33	45	**22**	Ont reçu 2 injections préparantes de 5 c.c. 95, sacrifié après 8 h., éosinophilie locale comme précédemment, moins intense.
28 F	5 c. c.	11	**9**	»	»	»	45	20	**35**	»	»	»	A reçu 3 injections préparantes de 5 c.c., sacrifié comme 95.
94	5 c. c.	20	**18**	31	18,6	50	19	23	**58**	5	45	50	A reçu 3 injections préparantes de 5 c.c.
98	5 c. c.	14	**20**	34	21	45	26	22	**52**	»	»	»	A reçu 4 injections préparantes de 5 c.c.

Tableau VIII (*suite*).

Cobayes préparés par des injections hebdomadaires d'extrait de sclérostome pratiquées dans le péritoine.

Numéros des cobayes	Doses injectées	Eosin. sang.	Eosin. périt. avant injection	Formules de l'exsudat 4 h. après l'injection			Formules de l'exsudat 8 h. après l'inject.			Formules de l'exsudat 24 h. après l'injection			Remarques
							Pol. pseudo	Monoc.	Eos.				
60	2 c. c.	22	6	»	»	»	55	30	15	»	»	»	A reçu 2 injections préparantes de 2 c.c.
48		12	5	»	»	»	56	29	15	»	»	»	
89		12	2	»	»	»	60	30	10	»	»	»	Ont reçu 4 injections préparantes de 2 c.c.

Cobayes préparés par 3 injections intra-péritonéales de 2 c. c. de sérum de cheval espacées de 3 jours en 3 jours.

Numéros des cobayes	Doses injectées	Eosin. sang.	Eosin. périt. avant injection	Formules de l'exsudat 4 h. après l'injection				Formules de l'exsudat 8 h. après l'inject.			Formules de l'exsudat 24 h. après l'injection				Remarques
				Pol. ps.	Mon.	Eos.	Mast.				Pol. ps.	Mon.	Eos.	Mast.	
62 F	2 c. c.	4	3	54	32	10	4	»	»	»	6	61	24	9	
54 F		3	1	41	43	12	4	»	»	»	9	73	14	4	
50 F		0	2	53	44	1	2	»	»	»	16	80	2	1	

l'on constate que, dans les premières heures qui suivent l'injection, les polynucléaires pseudo-éosinophiles du sang arrivent dans la cavité péritonéale en assez grande abondance. Ces cellules diminuent de nombre dès le lendemain de l'expérience. Beaucoup présentent un noyau très segmenté ou en voie de pycnose, ou sont phagocytées par les macrophages.

Ces expériences comportent une conclusion générale. Elles montrent à l'évidence que, lors de l'immunisation de l'animal par une substance éosinotactique, les propriétés chimiotactiques de l'éosinophile s'accroissent. Les éosinophiles deviennent beaucoup plus sensibles à l'action de la substance injectée, à l'appel de laquelle elles répondent avec une rapidité plus grande et en nombre beaucoup plus considérable. Dans ces conditions, étant donnés des cobayes accusant la même éosinophilie sanguine, on obtient une éosinophilie locale beaucoup plus intense chez les cobayes préparés que chez des cobayes neufs.

L'examen comparé des tissus infiltrés ou de l'exsudat péritonéal ne laisse aucun doute à cet égard.

Mais il y a plus, une nouvelle série d'expériences nous a prouvé qu'il existe une véritable spécificité de la réaction éosinotactique. Ainsi, des cobayes préparés par des injections répétées d'une substance éosinotactique donnée, réagissent incontestablement de façon beaucoup plus intense à l'injection de cette substance qu'à l'injection de toute autre substance éosinotactique.

Le tableau IX ci-dessous résume cette série d'expériences.

Il s'agit d'abord de trois cobayes préparés par trois injections sous-cutanées (10 cent. cubes d'extrait aqueux de *Tænia plicata*, filtré sur Chamberland et dilué au tiers) espacées de huit jours en huit jours. Chacun d'eux a reçu simultanément, en trois points aussi espacés que possible de l'abdomen, trois injections sous-cutanées de 1 cent. cube de substances parasitaires différentes : extrait de ténia, liquide hydatique et extrait de sclérostome. Ces animaux ont été sacrifiés un quart d'heure après les injections.

Or nous avons constaté, en pratiquant l'examen histologique, que le maximum des lésions (œdème très prononcé,

afflux leucocytaire dans les vaisseaux) et que le pourcentage le plus élevé des éosinophiles dans les capillaires s'observent justement au point où a été injecté l'extrait de ténia, c'est-à-dire la substance qui a servi à l'immunisation.

Les 14 autres observations résumées dans le même tableau vérifient, d'une façon plus remarquable encore, la loi énoncée plus haut de la spécificité de l'adaptation des cellules éosinophiles aux substances qui ont servi à l'immunisation.

Ainsi, chez les animaux préparés avec une des trois substances vermineuses indiquées plus haut, on ne peut produire l'afflux des éosinophiles du sang dans la cavité péritonéale qu'en y injectant la toxine spécifique qui a servi à l'immunisation. Dans tous les autres cas, les cobayes se comportent comme des cobayes neufs, c'est-à-dire que l'injection de la substance éosinotactique non spécifique est suivie d'un afflux de polynucléaires pseudo-éosinophiles dans l'exsudat et d'une chute apparente de l'éosinophilie locale préexistante.

Seul le cobaye 83 F fait exception à cette règle. Préparé par des injections d'extrait de ténia, il a présenté une hausse de l'éosinophilie locale après l'injection de liquide hydatique. Nous pensons qu'il s'agit là d'une réaction de groupe explicable par la parenté du *Tænia plicata* et du *Tænia echinococcus*.

Modifications de l'éosinophilie sanguine a la suite d'une injection de substance éosinotactique chez les cobayes en voie d'immunisation.

Nous avons suivi l'évolution de l'éosinophilie sanguine chez des cobayes préparés par des injections répétées de produits vermineux, et chez lesquels nous avions provoqué une éosinophilie locale par une injection sous-cutanée ou intra-péritonéale de la substance immunisante.

Déjà, dans nos recherches précédentes, nous avions eu l'occasion de constater que l'éosinophilie sanguine baisse, et parfois d'une façon considérable, à la suite d'une première injection sous-cutanée ou intrapéritonéale de liquide hydatique.

TABLEAU IX. — **Cobayes préparés, réinjectés sous la peau** (*3 piqûres en 3 points différents* de 1 c.c. T., 1 c.c. l. hyd., 1 c.c. scl. 1).

NUMÉROS DES COBAYES	ÉOSIN. SANGUINE	FORMULE leucocytaire dans les vaisseaux au point d'injec. de l'extrait de ténia				FORMULE leucocytaire dans les vaisseaux au point d'injec. du liquide hydatique				FORMULE leucocytaire dans les vaisseaux au point d'injec. de l'extrait de sclérostome				OBSERVATIONS
		Polyn.	Mon. L.	Mas.	Eos.	Pol.	Mon. L.	Mas.	Eos.	Pol.	Mon. L.	Mas.	Eos.	Cobayes préparés par 3 injections sous-cutanées, hebdomadaires, de 10 c. c. d'extrait de ténia dilué à 1/3
86 F	3	52	12	»	36	64	12	»	24	66	11	»	20	Cobayes sacrifiés après un 1/4 d'heure.
89 F	9	43	10	2	45	53	5	2	40	56	6	3	35	Œdème plus prononcé au niveau de l'injection de l'extrait de ténia; afflux leucocytaire plus marqué dans les vaisseaux du tissu conjonctif sous-cutané et intermusculaire.
87 F	34	13	4	2	83	30	6	»	64	33	8	»	59	

Cobayes préparés, réinjectés dans le péritoine avec la toxine ayant servi à la préparation.

NUMÉROS des cobayes	DOSES injectées	ÉOSIN. sanguine	EOS. péritonéale avant l'inj.	FORMULE leucocyt. de l'exsudat après 4 heures.				FORMULE leucocyt. de l'exsudat après 8 heures.				OBSERVATIONS
				Pol.	Monoc.	Mast.	Eos.	Pol.	Monoc.	Mast.	Eos.	
98 D	5 cc. liq. hyd.	15	8	54	19	»	27	. .	. .	. .	. .	Cobayes préparés par 3 injections hebdomadaires de 5 cc. de liquide hydatique sous la peau.
41 E		2	5	81	15	»	4	. .	. .	. .	. .	
72 F		1	6	. .	. .	. .	. .	6	75	»	19	3 injections préparantes de liquide hydatique.
83 F	5 cc. extrait de ténia.	10	25	. .	. .	. .	. .	30	35	»	35	3 injections préparantes d'extrait de ténia.
84 F		4	2	. .	. .	. .	. .	10	79	»	11	
98 F	5 cc. extrait sclérost.	0	4	. .	. .	. .	. .	32	60	2	6	3 injections préparantes d'extrait de sclérostome.

(1) T., extrait aqueux de ténia; L. hyd., liquide hydatique; Scl., extrait aqueux de sclérostome.

Cobayes préparés, réinjectés dans le péritoine avec une autre toxine que celle qui a servi à la préparation.

NUMÉROS des cobayes	DOSES injectées	EOS. SANGUINE	EOS. PERIT. avant l'injection	FORMULE LEUCOCYTAIRE DE L'EXSUDAT après 4 heures				après 24 h.				après 48 h.				OBSERVATIONS
				Pol.	Monoc.	Mas.	Eos.	Pol.	Monoc.	Mas.	Eos.	Pol.	Monoc.	Mas.	Eos.	
99 D	5 c.c. sclér.	12	8	93	6	»	1	..	..	..	..	..	..	..	..	Cobayes préparés par 3 injections hebdomadaires de 5 c. c. de liquide hydatique sous la peau.
83 D	5 c.c. ténia	35	15	90	9	»	1	..	..	..	..	..	..	..	..	
72 F	5 c.c. sclér.	3	10	83,3	13.3	»	3.3	54	43	»	3	27	67	»	6	Cobayes préparés par 3 injections hebdomadaires de 10 c. c. de liquide hydatique.
75 F	5 c.c. ténia	4	10	88,6	5	»	6,3	65	27	»	8	11	77	»	12	
83 F	5 c.c. liq. hyd.	20	20	58	12	0,3	29,6	25	35	»	40	»	75	»	25	Cobayes préparés par 3 injections sous-cutanées de 10 c. c. d'extrait de ténia dilué à 1/3.
84 F	5 c.c. sclér.	8	6	78	17	»	5	70	30	»	0	13	85	»	2	
97 F	5 c.c. liq. hyd.	1	30	77	10	»	13	20	55	3	22	»	70	3	27	Cobayes préparés par 3 injections sous-cutanées de 10 c. c. d'extrait de sclérostome dilué à 1/2.
98 F	5 c.c. ténia.	4	8	90	8	»	2	70	30	»	0	11	85	»	4	

Le tableau X résume nos observations.

Nous voyons que la chute de l'éosinophilie sanguine atteint son maximum d'intensité six à huit heures après l'injection, c'est-à-dire juste au moment où, comme nous l'avons indiqué dans le premier chapitre de ce travail, l'éosinophilie locale est complètement établie.

Tableau X.

NUMÉROS des cobayes.	POURCENTAGE DES ÉOSINOPHILES DU SANG						
	AVANT L'INJECTION	APRÈS L'INJECTION DE 6 A 10 C. C. DE LIQUIDE HYDATIQUE SOUS LA PEAU					
		1 heure.	2 heures.	4 heures.	6 heures.	8 heures.	24 heures.
93 B*	4	1,3	0,3	0,6	»	0,3	Sacrifié.
84 B*	5	3 »	2,6	0,6	»	0,3	1
19 M	9	5 »	»	4 »	1 »	0 »	7
47 B	10	»	5 »	2 »	»	0,6	3
65 C	11	6 »	4 »	2 »	0,3	Sacrifié.	
45 A	11	6 »	»	4 »	1 »	0 »	1
71 A	12	8 »	»	2 »	1 »	Sacrifié.	
62 M	13	10 »	»	2 »	0,3	0,6	2
13 B	13	»	»	4 »	2 »	3 »	13
14 B	16	»	»	8 »	6 »	10 »	18
16 A*	42	»	40,6	32 »	26 »	23 »	32

Les cobayes marqués d'un * ont reçu 6 cent.cubes.

Cette baisse de l'éosinophilie sanguine est encore plus prononcée et plus rapide, lorsque l'injection de substance éosinotactique est pratiquée chez des cobayes préparés par plusieurs injections préalables. Nos observations sur ce sujet sont résumées dans le tableau XI.

On voit que, dans ces conditions, la chute de l'éosinophilie sanguine est très précoce ; on l'observe déjà avec son maximum de netteté deux et quatre heures après l'injection. Les meilleurs résultats sont obtenus quand on injecte 10 cent. cubes de liquide hydatique sous la peau des cobayes préparés. Les injections de 5 cent. cubes de liquide hydatique sont suivies d'une baisse moins considérable du taux de l'éosinophilie sanguine, cependant très appréciable encore.

Tableau XI.

COBAYES PRÉPARÉS PAR 2 INJECTIONS SOUS-CUTANÉES DE 10 CENT. CUBES DE LIQUIDE HYDATIQUE.

Numéros des cobayes.	Doses injectées.	Éosinophilie sanguine avant l'injection.	Pourcentage des éosinophiles du sang. Après 1 heure.	Après 2 heures.	Après 4 heures.	Après 6 heures.	Après 8 heures.	Après 24 heures.
16 A.	10 cent. cubes	12 » p 100	3 »	1 »	0,3	0,6	»	35 »
14 B.	sous	20 » —	5 »	3 »	1 »	2 »	»	20 »
62 M.	la peau.	14 » —	5 »	0,3	2 »	3 »	»	16 »
COBAYES PRÉPARÉS PAR 2 INJECTIONS DE 5 CENT. CUBES DE LIQUIDE HYDATIQUE SOUS LA PEAU.								
84 D.		8,6 p. 100	6,6	0,6	4,6	11 »	13 »	14 »
98 D.	5 cent. cubes	20 » —	18 »	12,3	13 »	16,6	16,6	19,3
64 M.	sous	16,3 —	12 »	10,3	3,6	7,3	8,3	24 »
86 A.	la peau.	3,3 —	2 »	0,6	0,3	2,3	4,3	4 »
83 E.		22,3 —	19,3	14 »	13 »	13 »	14 »	35 »
41 C.		4,6 —	0,6	0,6	0 »	0,3	2,6	14,3

COBAYES PRÉPARÉS PAR 2 INJECTIONS DE 5 CENT. CUBES DE LIQUIDE HYDATIQUE DANS LE PÉRITOINE.

Nos des cob.	Doses injectées.	Éos. sang. avant l'inj.	Pourcent. des éosinoph. du sang Après 4 heures.	Après 8 heures.	Après 24 heures.
28 F	5 c. c.	11	2	9	»
94	hydat.	24	10	23	33
95	dans le	24	9	12	»
»	périt.	»	»	»	»

COBAYES PRÉPARÉS PAR 2 ET 4* INJECTIONS DE 2 CENT. CUBES D'EXTRAIT DE SCLÉROSTOME DANS LE PÉRITOINE.

Nos des cob.	Doses injectées.	Éos. sang. avant l'inj.	Pourcent. des éosinoph. du sang Après 4 heures.	Après 8 heures.	Après 24 heures.
*48	2 c.c.	12	7	3	»
*89	extr. de	12	5	8	16
60	sclé. dans	22	12	14	»
90	le pér.	8	2	8	13

Les faits mis en évidence par ces expériences nous ont permis d'émettre l'hypothèse que la chute de l'éosinophilie sanguine parfois très considérable que certains auteurs (Dévé, Chauffard, etc...) avaient constatée chez les opérés de kyste hydatique devait s'expliquer par une éosinophilie locale intense qui se produit au niveau du péritoine et dans les tissus périkystiques, où se résorbe le liquide épanché au cours de l'opération.

Il est vrai que dans un cas de Chauffard et Boidin (1), la

(1) CHAUFFARD et BOIDIN, L'éosinophilie hydatique ; sa genèse, etc... *Société médicale des Hôpitaux*, décembre 1907.

baisse de l'éosinophilie sanguine s'est produite après la ponction d'un kyste. L'éosinophilie sanguine est tombée de 6,25 p. 100 à 0,25 p. 100, après l'évacuation par ponction de 1.950 cent. cubes de liquide hydatique.

Nous pensons que la quantité de liquide épanché, même après la lésion produite par une aiguille capillaire, peut être suffisante pour provoquer une éosinophilie locale intense, surtout si la tension intrakystique est très élevée et le sujet opéré en état d'immunisation.

Il existe cependant une différence entre l'évolution de l'éosinophilie sanguine chez les cobayes préparés et chez les malades ayant subi l'opération. L'éosinophilie sanguine chez les cobayes se relève rapidement, et, vingt-quatre heures après l'injection, revient au chiffre constaté avant l'injection et souvent même le dépasse.

Il n'en est pas tout à fait de même chez l'homme, chez qui l'éosinophilie sanguine remonte en général plus lentement. Si, cependant, l'on pense au traumatisme considérable causé par la laparotomie et au retentissement que ce traumatisme peut avoir sur la formule sanguine, on s'explique aisément la différence qui existe entre l'évolution de l'éosinophilie sanguine chez les cobayes immunisés et chez les opérés de kyste hydatique. Cette discordance ne peut pas être considérée comme une objection sérieuse à l'explication que nous avons donnée de la chute de l'éosinophilie sanguine après l'intervention chirurgicale.

III. — ÉOSINOPHILIE ET ANAPHYLAXIE

L'éosinophilie locale dans le phénomène d'Arthus est un fait bien connu, dont Schlecht et Schwenker (1) ont fait récemment une étude histologique minutieuse. En pratiquant sous la peau des cobayes des injections répétées de 1 cent. cube de sérum humain inactivé, espacées tous les deux à trois jours, ces auteurs ont obtenu dans le tissu conjonctif sous-cutané une infiltration considérable de leucocytes éosinophiles. Alors que la première injection de sérum ne provoque sous la peau des cobayes qu'un

(1) Schlecht et Schwenker, Ueber die Beziehungen der Eosinophilie zur Anaphylaxie. *Deutsches Arch. f. klin. Med.* Vol. CVIII, fasc. 5, p. 405, 1913.

afflux de polynucléaires pseudo-éosinophiles, les 3e, 4e, 5e injections, etc..., déterminent l'arrivée locale d'un grand nombre d'éosinophiles, tous d'origine sanguine, associés à une proportion variable de polynucléaires pseudo-éosinophiles. Schlecht et Schwenker ont sacrifié leurs cobayes vingt-quatre heures après l'injection d'épreuve, et ont choisi pour leurs expériences des animaux qui, au moment de la première injection, ne possédaient qu'une éosinophilie sanguine très faible (0,3, 0,7, etc.).

Ajoutons que, pour ces auteurs, l'éosinophilie locale intense, constatée dans le phénomène d'Arthus, doit s'expliquer par l'action chimiotactique qu'exerce sur les éosinophiles du sang l'anaphylotoxine produite localement aux dépens des albumines du sérum, qui seraient dégradées par les diastases que sécrètent les leucocytes arrivés les premiers dans le tissu sous-cutané.

Vivement intéressés par les résultats de Schlecht et Schwenker, qui confirmaient nos recherches sur l'origine de l'éosinophilie expérimentale, nous comprenions cependant mal comment ces auteurs avaient pu obtenir une éosinophilie locale aussi considérable chez des cobayes à aussi faible éosinophilie sanguine.

En reprenant les expériences de Schlecht et Schwenker, nous nous sommes aperçus que chez tous nos animaux l'éosinophilie sanguine montait dès la 3e injection de sérum pratiquée sous la peau. Les injections étaient espacées de trois en trois jours. On savait déjà d'ailleurs que les injections répétées de sérum, comme toutes les injections de substances éosinotactiques, pouvaient augmenter le nombre des éosinophiles du sang. Si donc Schlecht et Schwenker ne constataient après la première injection de sérum que la présence dans l'hypoderme de pseudo-éosinophiles, c'est que leurs cobayes n'avaient à ce moment que très peu d'éosinophiles dans le sang. Si l'on rencontre, au contraire, une éosinophilie locale après la 3e, 4e et 5e injection de sérum, cela tient à ce que ces injections répétées ont fait s'accroître l'éosinophilie sanguine.

Pour expliquer l'intensité particulière de cette éosinophilie locale, nous avons émis une hypothèse différente de celle des auteurs allemands. Nous avons déjà indiqué dans le chapitre précédent que les injections répétées de produits parasitaires

agissaient sur les éosinophiles du sang en les rendant plus sensibles à l'action de la toxine. Cette action est du reste spécifique. Il n'est pas douteux que les injections répétées de liquide hydatique, d'extrait filtré de sclérostome et d'extrait filtré de ténia ne provoquent sous la peau le même phénomène que les injections répétées de sérum, c'est-à-dire le phénomène d'Arthus. Nous avons déjà signalé l'importance de l'œdème spécifique qui accompagnait les injections répétées de produits parasitaires. Cet œdème n'est pas le plus souvent suivi de nécrose. Il s'agit là évidemment d'un phénomène d'Arthus incomplet.

Pour nous, il faut considérer le phénomène d'Arthus, tel que l'ont décrit Schlecht et Schwenker, comme un phénomène complexe qui dépend à la fois de l'immunité et de l'anaphylaxie. Il est presque certain que l'on peut interpréter l'œdème comme un phénomène anaphylactique.

Mais alors que Schlecht et Schwenker considèrent que l'éosinophilie locale intense est provoquée par l'action chimiotactique de l'anaphylotoxine, rappelons ici que nous avons été amenés à interpréter, dans le chapitre précédent, l'afflux considérable des éosinophiles survenant dans ces conditions comme un phénomène d'adaptation fonctionnelle, c'est-à-dire d'immunité.

Notre manière de voir est consolidée par nos recherches sur l'éosinophilie locale et générale dans l'anaphylaxie.

Éosinophilie pulmonaire et Anaphylaxie.

Schlecht et Schwenker (1) ont observé une éosinophilie pulmonaire, localisée surtout autour des bronches et des bronchioles, survenant chez les cobayes sensibilisés deux à vingt-quatre heures après l'injection déchaînante péritonéale. Pour eux, cette éosinophilie serait due à l'action de l'anaphylotoxine qui se formerait dans l'organisme après la crise. Ces auteurs ont examiné les poumons d'un grand nombre de cobayes neufs ; ils n'ont jamais rencontré chez ces animaux qu'une éosinophilie

(1) Schlecht et Schwenker, Uber lokale Eosinophilie in den Bronchien und in der Lunge beim anaphylaktischen Meerschweinchen. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, vol. LXVIII, fasc. 3, p. 163, 1912.

pulmonaire légère, même chez les animaux à éosinophilie sanguine spontanée. Ströbel (1) déclare de même avoir observé une éosinophilie locale beaucoup plus intense dans les poumons des cobayes sacrifiés vingt-quatre heures après le choc anaphylactique non mortel, que dans ceux des animaux morts d'anaphylaxie aiguë ou des cobayes neufs sacrifiés comme témoins.

Ayant constaté, dans certains cas, l'absence complète d'éosinophilie pulmonaire, chez des animaux morts plusieurs heures après la crise anaphylactique, nous avons tenu à refaire les expériences de ces auteurs.

Le tableau XII résume nos observations.

Nous avons partagé nos cobayes préparés avec du sérum de cheval en deux lots. Les animaux du premier lot ont été sacrifiés en plein état anaphylactique, sans avoir reçu l'injection déchaînante. Ceux du deuxième lot ont été tués douze et vingt-quatre heures après l'injection d'épreuve pratiquée dans le péritoine.

L'étude des cobayes témoins nous a permis déjà de mettre en évidence deux faits : 1° Il existe une éosinophilie locale très marquée dans les poumons d'un certain nombre de cobayes sacrifiés, sans avoir subi le choc anaphylactique (4 sur 10) ; 2° cette éosinophilie locale est en rapport avec l'éosinophilie sanguine (Pl. XVI, fig. 5).

Nous avons trouvé à peu près le même pourcentage d'éosinophilie pulmonaire chez les animaux du deuxième lot ayant subi la crise anaphylactique (9 sur 22). Fait intéressant, l'éosinophilie locale se rencontre ici encore presque exclusivement chez les animaux présentant une forte éosinophilie sanguine.

D'autre part, les animaux chez lesquels l'éosinophilie sanguine était faible ou nulle n'ont pas présenté d'éosinophilie pulmonaire après la crise anaphylactique.

Signalons aussi le cas du cobaye 94 qui accusait avant le choc une éosinophilie sanguine de 9,6 p. 100, et dans les poumons duquel nous n'avons trouvé qu'un très petit nombre d'éosinophiles disséminés de place en place dans les alvéoles.

(1) Ströbel, Ueber anaphylaktische Reaktion der Lunge. *Münch. Med. Woch.*, 1912, n° 28, p. 1538.

TABLEAU XII. — **Anaphylaxie**

COBAYES SENSIBILISÉS SACRIFIÉS sans avoir reçu l'injection déchaînante			COBAYES INJECTÉS DANS LA VEINE									
			ANAPHYLAXIE AIGUE MORTELLE				CHOC NON MORTEL					
Numéros des cobayes.	Éosinophilie sanguine.	Éosinophilie pulmonaire.	Numéros des cobayes.	Doses.	Éosinophilie sanguine avant le choc.	Éosinophilie pulmonaire.	Numéros des cobayes.	Doses.	Éosinophilie sanguine avant le choc.	Éosinophilie sanguine après le choc.	Éosinophilie pulmonaire.	Observations.
24-4	0 »	0	76,4	1 c. c.	0 »	0	87-3	1/2 c.c.	0,3	»	0	mort dans la nuit.
81-3	0,3	0	100,3	Id.	1 »	0	»	»	»	»	»	»
82-4	2 »	faible.	42,4	Id.	1 »	nette.	12-4	Id.	14,3	15,6	faible.	sacrifié ap. 12 h.
20-4	2 »	0	31,4	Id.	0 »	0	»	»	»	»	»	»
78-4	3 »	0	41,4	Id.	0,3	faible	4-4	1 c. c	0,6	1	0	sacrifiés après 24 heures.
51-4	3 »	faible.	27,4	Id.	4 »	faible	»	»	»	»	»	
45-4	8,3	nette.	61,3	Id.	8,6	nette.	52-4	Id.	50 »	47 »	forte.	
44-4	11,6	nette.	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»
66-3	15 »	forte.	»	»	»	»	»	»	»	»	»	très malades sacrifiés après 24 heures.
57-3	30,6	forte.	51 »	1/3 c. c.	12,3	nette.	42 »	1/8 c.c.	1 »	»	0	
	»	»	82 »	Id.	0,3	0	88 »	Id.	3,3	»	0	

Nous avons également étudié les poumons des cobayes, chez lesquels la crise anaphylactique avait été provoquée par l'injection intraveineuse. Sur 15 cobayes, 9 sont morts en quelques minutes d'accidents suraigus.

Sur ce nombre, 3 ont présenté une infiltration éosinophilique pulmonaire intense, qui ne peut évidemment pas être mise sur le compte de l'anaphylaxie, puisque, dans ces conditions, même d'après Schlecht et Schwenker, une infiltration du tissu péribronchique par les éosinophiles n'aurait pas le temps de s'établir.

et éosinophilie pulmonaire.

COBAYES INJECTÉS DANS LE PÉRITOINE											
SACRIFIÉS APRÈS 12 HEURES						SACRIFIÉS APRÈS 24 HEURES					
Numéros des cobayes.	Doses	Éosinophilie sanguine avant le choc.	Éosinophilie sanguine 12h après le choc.	Éosinophilie pulmonaire.	Observations.	Numéros des cobayes.	Doses.	Éosinophilie sanguine avant le choc.	Éosinophilie sanguine 24h après le choc.	Éosinophilie pulmonaire.	Observations.
16-4	1 c. c.	0 »	0 »	0	très malade	14-4	1 c. c.	0.3	2 »	0	»
10-4	Id.	0,6	0 »	0	»	50-4	Id.	0,3	2 »	faible	»
99-3	Id.	0 »	0.6	nette.	très malade	71-4	Id.	0 »	2,3	faible	très malade.
86-3	Id.	0.6	1,6	0	très malade	43-4	2 c. c.	0,3	5,6	0	»
33-4	Id.	0 »	2 »	faible	très malade	5-4	1 c. c.	0 »	5,3	0	très malade.
91-4	Id.	0 »	3.6	faible	»	86-4	Id.	0 »	9,3	faible	
30-6	2 c. c.	4,0	16 »	nette.	»	4-3	Id.	0 »	12,3	nette	»
33-3	1 c. c.	5,3	17,6	forte	très malade	38-4	Id.	15,6	14,3	nette	très malade.
89-3	1 c. c.	10 »	»	forte	»	94-3	2 c. c.	9,6	16,3	0	très malade.
						13-4	1 c. c.	17.0	29 »	forte	
						34-4	Id.	8.6	»	forte	
						29	Id.	14.6	21.3	nette	1 heure ap. le choc 2,6 (Eosinoph.)
						75-5	Id.	1 »	2	0	1 heure ap. le choc 0.3 (Eosinoph.)

Si nous ajoutons maintenant à tous ces faits, qu'il nous était le plus souvent impossible de trouver une différence quelconque entre l'intensité de l'éosinophilie pulmonaire observée soit chez les cobayes témoins, soit chez ceux morts d'anaphylaxie suraiguë, soit enfin chez ceux sacrifiés dans les conditions établies par Schlecht et Schwenker, nous sommes obligés de conclure que l'éosinophilie pulmonaire constatée par ces auteurs n'est pas une éosinophilie locale provoquée par la toxine anaphylactique, mais qu'il s'agit là d'une éosinophilie chronique spontanée.

Éosinophilie sanguine et Anaphylaxie.

Schlecht (1) a fait cette constatation intéressante que le pourcentage des éosinophiles du sang s'élève chez les animaux qui ont subi des injections de sérum répétées et espacées à quelques jours d'intervalle. Dans des travaux ultérieurs, publiés avec Schwenker, il a montré que le même phénomène se produit chez les cobayes sensibilisés avec du sérum, vingt-quatre à soixante-douze heures après l'injection déchaînante pratiquée dans le péritoine. Il attribue cette hausse de l'éosinophilie sanguine à l'action de l'anaphylotoxine. L'observation de Schlecht a été confirmée par Herrick (2) dans l'anaphylaxie ascaridienne.

Le phénomène noté par Schlecht est absolument exact; nous avons pu le reproduire chez les animaux sensibilisés avec du sérum et avec différents produits vermineux. Mais, si l'existence de ce phénomène est indiscutable, l'interprétation donnée par Schlecht nous paraît erronée.

Quatre ordres de faits nous permettent de l'affirmer : 1° D'abord, la hausse de l'éosinophilie n'est nullement en rapport avec la gravité des phénomènes anaphylactiques provoqués, comme l'avait déjà remarqué Herrick. Nous avons indiqué, dans le tableau XIII, quels étaient parmi les cobayes éprouvés par la voie péritonéale, ceux qui avaient subi une crise anaphylactique très grave, avec tremblements, contractures, paralysies, etc. Nous voyons que la hausse de l'éosinophilie n'est pas plus accusée chez ces animaux que chez ceux n'ayant présenté que des accidents anaphylactiques insignifiants; 2° les éosinophiles augmentent de nombre dans le sang des cobayes sensibilisés, lorsque l'injection d'épreuve est faite sous la peau, sans donner lieu au moindre symptôme morbide. En se reportant au tableau XIII, on voit que, chez 10 cobayes ainsi éprouvés, le

(1) Schlecht, Uber die Einwirkung von Seruminjectionen auf die Eosinophilen, etc... *Deutsch. Arch. f. klin. Med.*, vol. XCVIII, p. 308, 1910.

(2) Herrick, Experimental eosinophilia with an extract of an animal parasite. *Arch. of. internal Med.* t. XI, p. 165, 1913.

taux de l'éosinophilie sanguine s'est fortement élevé chez tous les cobayes sans exception, vingt-quatre heures après l'injection sous-cutanée de 2 cent. cubes de sérum; 3° La crise anaphylactique, quelle que soit son intensité, n'est généralement pas suivie d'une hausse de l'éosinophilie, lorsque l'injection déchaînante a été pratiquée dans la veine (voir le tableau XIII); 4° nous avons enfin provoqué les phénomènes anaphylactiques chez les cobayes préparés avec du sérum de cobayes sensibilisés par le sérum de cheval. Dans ces conditions, l'injection dans le péritoine des cobayes de 2 cent. cubes de sérum de cheval a provoqué des symptômes d'anaphylaxie passive sans que, pour cela, le pourcentage des éosinophiles du sang ait accusé la moindre hausse.

Cet ensemble de faits nous permet d'affirmer qu'il n'existe pas de relation de cause à effet entre la hausse de l'éosinophilie sanguine survenant dans certaines conditions après l'injection déchaînante et la production dans l'organisme de toxine anaphylactique. Quand les éosinophiles augmentent de nombre dans le sang après la crise anaphylactique, il s'agit là, pensons-nous, d'une coïncidence. La hausse de l'éosinophilie est un phénomène d'immunité qui s'explique par l'action qu'exerce l'antigène sur les centres hématopoiétiques, et spécialement sur la moelle osseuse, préparés à réagir à la suite de la première injection. Elle a la même signification que celle que l'on observe à la suite d'injections répétées et rapprochées à de courts intervalles d'une substance éosinotactique quelconque.

Ajoutons, avant de terminer ce chapitre, un fait intéressant constaté au cours de notre travail. Les injections répétées de certaines substances éosinotactiques, comme le sérum de cheval par exemple, provoquent, en même temps qu'une hausse de l'éosinophilie sanguine, une augmentation notable du nombre des mastzellen dans le sang. Ce fait déjà signalé par Schlecht (1) a été également noté par Ahl et Schittenhelm (2) à la suite d'injections d'albumines variées. Le tableau XIV que nous donnons ici à titre de document, résume quelques-unes

(1) Schlecht, *loc. cit.*

(2) Ahl et Schittenhelm. Ueber experimentelle Eosinophilie, etc., *Zeitsch. f. die gesam. exp. Med.*, 1913, t. I, fasc. 1 et 2, p. 111.

TABLEAU XIII. — **Éosinophilie sanguine**

COBAYES NEUFS ÉTUDIÉS 24 HEURES après l'injection de sérum.					COBAYES									
					INJECTÉS SOUS LA PEAU					ÉPROUVÉS DANS LE PÉRITOINE ÉTUDIÉS APRÈS 12 HEURES				
Numéros des cobayes.	Doses.	Éos. sanguine avant l'injection.	Éos. sanguine. 24h après l'inject.	Observations.	Numéros des cobayes.	Doses.	Éos. sanguine avant l'épreuve.	Éos. sanguine 24h après l'épreuve	Observations.	Numéros des cobayes	Doses.	Éos. sanguine avant l'épreuve.	Éos. sanguine. après l'épreuve.	Observations.
26 I.	2 cent. cubes de sérum de cheval.	0 »	0,3	Injection sous-cutanée.	67-D	2c.c.	0 »	2,6	Les cobayes n'ont présenté aucun accident anaphylactique.	16-4	1 c.c.	0 »	0 »	tr. malade
25 »		0 »	0 »		»	»	»	»		»	»	»	»	»
23 »		0 »	0,3		32 9	Id.	0 »	4,3		10-4	Id.	0,6	0 »	»
24 »		0,3	0 »		»	»	»	»		»	»	»	»	»
22 »		0,6	0 »		40-9	Id.	0,3	3 »		93-4	Id.	0 »	0,6	très malade.
40 F.		0,3	0 »		»	»	»	»		»	»	»	»	»
38 »		0,6	0,3		34-9	Id.	0,6	3,3		86-4	Id.	0,6	1,6	très malade.
33 »		1 »	1 »		»	»	»	»		»	»	»	»	»
31 »		2 »	1 »		57-9	Id.	1 »	2,6		32-4	Id.	0 »	2 »	très malade.
30 »		3 »	2 »		»	»	»	»		»	»	»	»	»
65 »		6 »	6 »		72-9	Id.	1 »	17,3		92-4	Id.	0 »	3,6	»
21 I.		7,6	3,3		»	»	»	»		»	»	»	»	»
»		»	»	—	55-9	Id.	4 »	8,3		33-4	Id.	5,3	17,6	très malade.
28 I.		0 »	0 »	Injection intrapéritonéale.	»	»	»	»		»	»	»	»	»
29 »		0 »	0 »		81-8	Id.	5,3	18 »		30,4	2c.c.	4 »	16 »	»
30 »		0 »	0,6		»	»	»	»						
32 »		0 »	0 »		79-D	Id.	8 »	27,6						
48 F.		0 »	0 »		»	»	»	»						
52 »		0 »	1 »		95-8	Id.	9	19,3						
62 »		0,3	0,3											
31 I.		0,5	1,3											
54 F.		0,3	2 »											
50 »		0,3	4 »											
27 I.		3,3	0,6											
45 F.		10 »	1,7											

SENSIBILISÉS										ANAPHYLAXIE PASSIVE						
ÉPROUVÉS DANS LE PÉRITOINE ÉTUDIÉS APRÈS 24 HEURES					ÉPROUVÉS PAR VOIE VEINEUSE											
Numéros des cobayes.	Doses.	Éos. sanguine avant l'épreuve.	Éos. sanguine après l'épreuve.	Observations.	Numéros des cobayes.	Doses.	Éos. sanguine avant l'épreuve.	Éos. sanguine après l'épreuve.	Observations.	Numéros des cobayes.	Doses préparantes.	Éos. sanguine avant l'inj. prépar.	Doses d'épreuves	Éos. sanguine avant l'épreuve.	Éos. sanguine après l'épreuve.	Observations.
71-4	1 cc.	0 »	2,3	très malade	12-3	1/2c.c.	14,3	15,6	sacrifié après 12 h.	88-I	2 cent. cubes de sérum de cobaye sensibilisé sous la peau.	0 »	2 cent. cubes de sérum de cheval dans le péritoine.	0,3	1 »	»
5-4	Id.	0 »	5,3	très malade	»	»	»	»		»		»		»	»	»
86-4	Id.	0 »	9,3	»	4-4	1 c.c.	0,6	1 »	sacrifiés après 24 heures.	89 »		0 »		0 »	0 »	»
4-5	Id.	0 »	12,3	»	»	»	»	»		»		»		»	»	»
14-4	Id.	0,3	2 »	»	52-4	Id.	50 »	47 »		86 »		0,3		0 »	0 »	»
50-6	Id.	0,3	2 »	»	»	»	»	»		»		»		»	»	»
75-4	Id.	1 »	2 »	»	22-21	1/4 c.c.	1	4 »		85 »		0,6		2,3	4 »	»
38-4	Id.	15,6	14,3	très malade	»	»	»	»		»		»		»	»	»
23-4	Id.	17,6	29 »	»	51-9	1/100 c.c.	0	0 »		95 »		0,6		2,6	2 »	»
29-E	Id.	14,6	21,6	»	»	»	»	»		»		»		»	»	»
»	»	»	»	»	71-D	Id.	0	0,3		91 »		1 »		0 »	0 »	»
49-9	2 c.c.	0,3	1 »	très malade	»	»	»	»		»		»		»	»	»
43-4	Id.	0,3	5,6	»	55-7	Id.	1	1 »		90 »		1 »		1,6	3 »	»
76-9	Id.	0,3	6 »	très malade	»	»	»	»		»		»		»	»	»
81-9	Id.	0,3	18 »	très malade	67-9	Id.	22 »	22 »		92 »		1,3		0,3	0,3	»
11-9	Id.	2,3	12,3	très malade	»	»	»	»	»	»		»		»	»	»
82-9	Id.	6 »	12 »	très malade	»	»	»	»	»	94 »		2,6		1,3	0,3	très malade.
94-3	Id.	9,6	16,3	très malade	»	»	»	»	»	»		»		»	»	»
61-9	Id.	14 »	14 »	très malade	»	»	»	»	»	87 »		2,6		1,3	1 »	»

de nos observations. Il montre, en plus du fait que nous venons d'indiquer, que le pourcentage des mastzellen s'élève dans le sang après l'épreuve anaphylactique, provoquée par l'injection intrapéritonéale ou sous-cutanée de sérum de cheval, chez les cobayes sensibilisés.

Tableau XIV. — Augmentation des Mastzellen du sang chez les animaux ayant reçu des injections répétées de sérum de cheval

Cobayes sensibilisés — Éprouvés dans le péritoine			Cobayes sensibilisés — Injectés sous la peau			Cobayes ayant reçu sous la peau, 3 injections de 2 c. c. de sérum à 3 jours d'intervalle.		
Nos des cobayes.	Mast. avant épreuve	Mast. après épreuve	Nos des cobayes.	Mast. avant épreuve	Mast après épreuve	Nos des cobayes.	Mast. 24 h. après la 1re inj.	Mast. 24 h. après la 3e inj.
	p. 100	p. 100		p. 100	p. 100		p. 100	p. 100.
61-9	2 »	31 »	79,0	3 »	3,3	62 F.	1	7
82-9	2 »	5 »	81,8	0,3	2,3	50 F.	2	6
11-9	2 »	3 »	32,9	1 »	0 »	30 F.	1	12
81-9	1 »	2 »	55,9	0 »	9,6	54 »	2	7
76-9	1 »	0 »	76,0	3 »	2,3	33 »	1	1
49-9	1 »	5 »	34,9	0,3	0,6	38 »	1	4
13-4	0,6	0,3	40,9	0,6	3,6	65 »	1	7
50-6	2 »	4,3	57,9	2 »	5,3			
43-4	0,6	3 »	71,9	1 »	1 »			
94-3	0 »	10 »	95,8	1 »	4,6			
86-4	0,6	2,6						
14-4	0,3	3 »						
4-5	0,3	4 »						
71-3	0,3	3,6						

Conclusions.

1° Les éosinophiles possèdent, comme tous les globules blancs, des propriétés chimiotactiques. Ils sont beaucoup plus sensibles que les autres variétés de leucocytes à l'action attractive qu'exercent sur eux certaines substances toxiques, surtout celles d'origine parasitaire.

Lorsque ces substances « éosinotactiques » sont résorbées dans les tissus malades ou infectés, elles y provoquent un appel plus ou moins considérable d'éosinophiles, et déterminent ainsi la formation d'une éosinophilie locale.

2° L'étude expérimentale des conditions dans lesquelles on peut reproduire l'éosinophilie locale permet de dégager la loi

suivante : on ne peut provoquer une éosinophilie locale que chez des animaux présentant une éosinophilie sanguine. L'intensité de cette éosinophilie locale ne dépend pas seulement du pouvoir éosinotactique différent, propre à chaque substance toxique ou parasitaire, mais encore, et surtout, de l'abondance des éosinophiles dans le sang de l'animal en expérience. Lorsque les éosinophiles font défaut ou sont très peu nombreux dans le sang, les substances « éosinotactiques » provoquent un afflux local considérable de polynucléaires neutrophiles. Ces substances agissent donc seulement de préférence, mais non exclusivement sur l'éosinophile. Nous ne connaissons pas de substances qui soient exclusivement éosinotactiques.

3° Nous avons dégagé cette loi, en provoquant avec divers produits vermineux une éosinophilie locale dans le tissu conjonctif de la paupière du cheval, sous la peau et dans les muscles du cobaye. Les mêmes substances, facilement diffusibles, injectées dans la cavité péritonéale des cobayes neufs, n'ont pas provoqué l'afflux des éosinophiles du sang dans l'exsudat péritonéal. Dans ces conditions, les éosinophiles s'arrêtent dans les tissus au voisinage du péritoine, et c'est là que l'éosinophilie locale se constitue.

Ajoutons que, pour pouvoir interpréter ces expériences, il est nécessaire de tenir compte de l'éosinophilie péritonéale spontanée, si fréquente et parfois si intense chez les cobayes neufs.

4° L'éosinophilie locale expérimentale s'établit en quelques heures. Une fois arrivés dans le tissu conjonctif, les éosinophiles y restent très longtemps ; si, pendant ce temps, pour une cause quelconque, l'éosinophilie sanguine vient à disparaître, et si l'on étudie, à ce moment-là, à la fois l'éosinophilie sanguine et l'éosinophilie locale, on note fatalement une discordance entre ces deux phénomènes. Des résultats contradictoires ont ainsi pu être obtenus par quelques auteurs qui ont étudié les rapports de l'éosinophilie sanguine et de l'éosinophilie locale, surtout dans certaines affections de la peau.

5° L'étude de l'éosinophilie locale, qui se produit aux points de fixation de différentes espèces parasitaires sur la muqueuse intestinale du cheval, confirme entièrement la loi générale que nous venons d'énoncer.

6° Dans l'éosinophilie locale expérimentale, et dans l'éosinophilie locale observée aux points de fixation de divers parasites, nous n'avons rencontré que des éosinophiles du sang à noyau bilobé ou segmenté. Jamais nous n'avons observé la transformation sur place d'éléments cellulaires quelconques en cellules éosinophiles.

Pour ce qui est des éosinophiles mononucléaires, que nous avons observés dans l'exsudat péritonéal des cobayes neufs, nous pensons que leur formation doit avoir la même cause que celle qui détermine l'apparition d'éléments semblables signalés dans d'autres exsudats de l'organisme (exsudat pleural, liquide céphalo-rachidien, etc.). Comme la présence de ces éléments est liée, d'après nous, non pas à un processus aigu, mais à un processus chronique, nous réservons l'étude complète de cette question pour un prochain mémoire, qui traitera de l'éosinophilie chronique.

7° Lorsqu'on immunise des cobayes par des injections répétées d'une substance éosinotactique, on constate que, chez un animal préparé, l'injection sous la peau ou dans le péritoine de la toxine immunisante provoque, beaucoup plus rapidement que chez les animaux neufs, une éosinophilie locale, beaucoup plus intense. Ceci est démontré, entre autres, par la possibilité qu'il y a d'obtenir un afflux des éosinophiles du sang dans la cavité péritonéale des cobayes préparés, ce qui, comme nous le savons, n'est pas possible chez les cobayes neufs. Nous avons ainsi trouvé un procédé pour obtenir un exsudat péritonéal très riche en leucocytes éosinophiles (jusqu'à 70 p. 100), ce qui facilite l'étude de leurs propriétés biologiques.

8° Au cours de l'immunisation, la sensibilité chimiotactique de l'éosinophile est très fortement accrue. C'est là certainement une preuve du rôle que jouent les éosinophiles dans l'immunité vis-à-vis de certaines substances toxiques, d'origine microbienne ou parasitaire, d'autant plus que nous avons pu prouver que cette adaptation fonctionnelle de l'éosinophile était étroitement spécifique.

9° Comme l'éosinophilie locale aiguë s'alimente aux dépens de l'éosinophilie sanguine, elle provoque nécessairement un appauvrissement momentané du sang circulant en éosinophiles. Cette baisse de l'éosinophilie sanguine est d'autant plus

marquée que la lésion locale est provoquée sur une plus grande étendue, et que l'animal chez lequel on l'observe est plus fortement immunisé contre la toxine qui a servi à l'injection locale.

Ce fait permet d'expliquer l'abaissement du taux de l'éosinophilie sanguine, observé après l'opération de kyste hydatique. Nous savons, en effet, que l'intervention chirurgicale s'accompagne presque toujours d'une résorption locale étendue de liquide hydatique.

10° L'éosinophilie locale parfois intense, observée dans le phénomène d'Arthus, a été attribuée par quelques auteurs à l'action chimiotactique de l'anaphylotoxine.

Deux arguments principaux sont invoqués pour démontrer les rapports directs qui existeraient entre l'éosinophilie et l'état anaphylactique. De ces deux faits, le premier est inexact, l'autre nous paraît mal interprété.

L'injection d'épreuve pratiquée dans le péritoine ne détermine pas d'éosinophilie locale dans les poumons des animaux qui ont survécu au choc anaphylactique. L'éosinophilie pulmonaire, signalée par quelques auteurs et considérée par eux comme une lésion caractéristique de l'anaphylaxie non mortelle, préexiste chez la plupart des cobayes à éosinophilie sanguine un peu marquée.

Quant à la hausse de l'éosinophilie sanguine, qui survient vingt-quatre heures après l'injection d'épreuve pratiquée dans le péritoine des cobayes sensibilisés, elle ne peut pas être non plus considérée comme une conséquence de l'anaphylaxie.

Nous l'expliquons par l'action directe de l'antigène sur les centres hématopoiétiques, déjà préparés à réagir à la suite de l'injection sensibilisante.

PLANCHE XV

Fig. 1. — Paupière d'un cheval instillé dans l'œil avec du liquide ascaridien. Fixée par le liquide de Bouin. Coloration par l'hématéine-éosine diluée. Grossissement 360/1.

Le cheval avait une forte éosinophilie sanguine. La paupière a été réséquée dix minutes après l'instillation, les capillaires sont bourrés d'éosinophiles. On n'observe pas encore de diapédèse.

Ép., épithélium de la muqueuse palpébrale; *Tc*, tissu conjonctif du chorion non infiltré; *c*, capillaires bourrées d'éosinophiles.

Fig. 2. — Même matériel. Le cheval avait une forte éosinophilie sanguine. La paupière a été réséquée une demi-heure après l'instillation. On voit les éosinophiles sortir des capillaires par diapédèse, avant les autres variétés de leucocytes.

Pol., polynucléaires neutrophiles; *éos.* a, éosinophile en diapédèse; *éos.* b, éosinophiles sortis du capillaire.

Fig. 3. — Même matériel. Le cheval avait une forte éosinophilie sanguine. La paupière a été réséquée deux heures après l'instillation. L'éosinophilie est établie. On voit dans le tissu conjonctif de nombreux éosinophiles du sang associés à d'autres leucocytes. Les éosinophiles forment un manchon autour du capillaire, dont ils dissocient les cellules périthéliales.

Pol., polynucléaire neutrophile; *éos.*, éosinophile; G, gaine éosinophilique périvasculaire.

Fig. 4. — Même matériel. Le cheval n'avait pas d'éosinophiles dans le sang. La paupière a été réséquée un quart d'heure après l'instillation. Le capillaire est bourré de polynucléaires neutrophiles.

Pol., polynucléaire neutrophile sorti du vaisseau; *c*, capillaire bourré de neutrophiles.

PLANCHE XVI

Fig. 5. — Poumon d'un cobaye sacrifié sans avoir reçu l'injection d'épreuve. Même technique. Grossissement 300/1. Le cobaye présentait une forte éosinophilie sanguine. On voit une infiltration du poumon par les éosinophiles, localisée surtout autour de la bronchiole.

Br., bronchiole; *éos.* a, éosinophile s'insinuant entre les cellules épithéliales de la bronchiole; *eos.* b, amas d'éosinophiles péribronchique.

Fig. 6. — Bouton de fixation d'un sclérostome sur la muqueuse du gros intestin du cheval. Même technique. Grossissement 80/1.

La muqueuse est aspirée dans la capsule buccale du parasite. Les glandes de Lieberkühn sont presque complètement détruites. Le cheval avait une forte éosinophilie sanguine. Le bouton de fixation est infiltré par des éosinophiles du sang qui se disposent en amas confluents.

Caps., capsule buccale du sclérostome; *ch.*, chorion de la muqueuse détruite en partie par le parasite; *Mus.*, *muscularis mucosæ*; *S. m.*, sous-muqueuse; *éos.*, amas d'éosinophiles; *ch.*, chorion de la muqueuse intact.

LA NEURONOPHAGIE DANS LA POLIOMYÉLITE

par C. LEVADITI et J. PIGNOT

(Avec la planche XVII.)

L'existence du phénomène de la neuronophagie dans la poliomyélite aiguë a été signalée par la plupart des auteurs qui ont étudié l'anatomie pathologique de cette infection chez l'homme. Les détails du processus phagocytaire qui préside à la destruction des neurones moteurs de la moelle et des centres bulbo-protubérantiels ont été précisés surtout par Forsner et Sjövall (1) et par Wickman (2). Mais, avant l'ère toute récente de l'expérimentation, il était impossible de suivre pas à pas l'évolution de la neuronophagie, les matériaux humains se prêtant mal à ce genre de recherches. Il en fut autrement lorsque la transmission de la paralysie infantile au singe permit le prélèvement des pièces à tous les moments de l'infection ; la neuronophagie fut alors suivie depuis le stade initial jusqu'à sa phase terminale, marquée par l'anéantissement total de la cellule nerveuse.

En procédant de la sorte, nous avons montré, avec Landsteiner (3), que le processus évolue en deux temps. Le neurone commence par présenter des signes nets de dégénérescence, se traduisant par des altérations à la fois nucléaires et protoplasmiques. Ensuite, il est envahi par des cellules migratrices, la plupart d'origine sanguine, polynucléaires et macrophages. Ces éléments achèvent la destruction de la cellule nerveuse. Les polynucléaires, qui arrivent les premiers, s'insinuent dans le cytoplasma, y creusent des cavités et s'entourent d'une zone claire, paraissant dénoter une action lytique

(1) Forsner et Sjövall, *Zeitschr. f. klin. Med.*, 1907.
(2) Wickman, *Deutsche Zeitschr. für Nervenheilkunde*, 1910, t. XXXVIII, p. 396.
(3) Landsteiner et Leviditi, *Annales de l'Institut Pasteur*, novembre 1910, n° 11, p. 833.

exercée par les ferments leucocytaires sur le protoplasma. Les macrophages apparaissent le plus souvent vers la fin du processus; ils semblent parfaire l'œuvre destructrice des polynucléaires, en réalisant la résorption des détritus nucléo-protoplasmiques. Ces données nous ont fait admettre que la pullulation du virus dans la cellule nerveuse, cause première de la dégénérescence du neurone, détermine un appel chimiotaxique sur les polynucléaires. Ceux-ci doivent exercer une double fonction : l'englobement phagocytaire du microbe et l'histolyse de la cellule nerveuse. Par contre, les macrophages, dont le rôle dans la résorption des tissus est bien connu, arrivent vers la phase terminale du processus pour achever la résorption de ce qui fut le neurone moteur.

Cette résorption des détritus nucléo-protoplasmiques par les cellules migratrices, nous l'admettions comme tous les auteurs qui ont eu à s'occuper de la neuronophagie; mais, comme la plupart d'entre eux, nous n'apportions aucune preuve directe. En effet, pour désigner le phénomène par le terme « neuronophagie », pris à la lettre, il faut déceler, dans le protoplasma des polynucléaires ou des macrophages qui envahissent le neurone, des produits bien définis, ayant fait partie intégrante de ce neurone. Or, par les méthodes employées alors, il nous était impossible de faire une telle constatation.

C'est là une question d'ordre général qui intéresse le problème de la neuronophagie dans son ensemble. Nous l'avons traitée dans une note présentée récemment à la Société de Biologie (1). Nous avons insisté, d'une part, sur ce que le terme de neuronophagie contient de vague, tant qu'on n'aura pas décelé dans les neuronophages des parties intégrantes de la cellule nerveuse et, d'autre part, sur la tendance que l'on montre à englober dans la neuronophagie proprement dite des phénomènes qui nous paraissent comporter une tout autre interprétation. Nous en avons ainsi dégagé le processus de la *neurathrepsie*, atrophie primaire du neurone, par suite d'une assimilation défectueuse, et hyperplasie consécutive des cellules satellites, sans phagocytose proprement dite. Ce phénomène est à rapprocher

(1) Levaditi, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1914, t. LXXVI, p. 474.

de ce que l'on voit dans la vieillesse [Pugnat, Metchnikoff (1)] et existe fréquemment dans les ganglions spinaux cultivés *in vitro* [Marinesco et Minea (2), Levaditi (3)].

Parmi les auteurs qui ont soutenu la réalité de la neuronophagie, englobement proprement dit des débris du neurone par les éléments migrateurs, nous avons cité, en premier lieu, Manouélian (4). Ce chercheur s'est servi, comme matériel d'étude, de tissu nerveux rabique et y a découvert des processus qui, à notre avis, ne laissent aucun doute sur cette phagocytose de la cellule nerveuse. En effet, plus d'une fois, il a décelé, par une technique spéciale, des granulations pigmentaires dans les éléments migrateurs et les cellules satellites, granulations qui avaient appartenu à la cellule nerveuse.

Il n'en est pas moins vrai, cependant, que cette preuve en faveur de la réalité de la neuronophagie pourrait, à la rigueur, être discutée, attendu que les particules, supposées phagocytées, étaient de nature pigmentaire. Or le pigment, étant un produit assez généralisé dans l'organisme, peut apparaître à la fois dans le neurone et dans les cellules satellites. De fait, une telle objection a été formulée par Marinesco. Dans sa monographie sur *La cellule nerveuse* (5), cet auteur s'exprime ainsi à ce propos :

« Il est vrai que M. Manouélian a soutenu dernièrement que la présence du pigment à l'intérieur des cellules satellites proliférées autour des cellules des ganglions spinaux serait une preuve indiscutable en faveur de la neuronophagie exercée par ces cellules. A cette constatation de M. Manouélian, qui est exacte, je pourrais faire observer qu'on rencontre du pigment dans les cellules satellites dans les états pathologiques les plus divers. Puis, Castelli a montré que les cellules satellites peuvent absorber des granulations d'encre de Chine tout comme les cellules nerveuses, du reste. De son côté, Alzheimer a soutenu aussi la même opinion pour le pigment. Il en résulte que l'existence du pigment dans les cellules satellites, soit dans la

(1) Metchnikoff, Mesnil et Weinberg, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1902, n° 12, p. 912.

(2) Marinesco et Minea, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1913, t. LXXV, p. 202.

(3) Levaditi. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1913.

(4) Manouélian, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1906, t. XX, p. 859.

(5) Marinesco, *La cellule nerveuse*, t. II, p. 483, Paris, Doin.

rage, soit dans d'autres maladies, ne constitue pas une preuve indéniable que ce pigment provient de la digestion des cellules nerveuses. »

Pareille objection ne saurait être adressée aux constatations que nous désirons exposer dans ce mémoire. Nos études sur l'histologie pathologique de la poliomyélite expérimentale du singe, faites, au début, en collaboration avec Mlle Léoneano (1), nous ont permis de saisir sur le fait l'englobement des parties intégrantes des neurones par les phagocytes, dans des conditions appelées à entraîner la conviction des plus sceptiques. Il s'agit de *la phagocytose des granulations oxyphiles des cellules nerveuses des ganglions spinaux par les polynucléaires et les macrophages qui envahissent le protoplasma de ces cellules.*

Un mot, tout d'abord, sur *les caractères et la distribution de ces granulations.*

D'après Marinesco (2), les granulations en question ont été vues, par Lévi (3) dans les cellules des ganglions lombaires du lapin. Sur des préparations colorées par la fuchsine acide et le vert de méthyle, les *granulations fuchsinophiles* de Lévi apparaissent teintes en rouge et sont agglomérées en amas vers un des pôles de la cellule. Le repos ou l'activité de ces cellules paraissent exercer une influence manifeste sur la quantité, le volume et la distribution de ces granulations. Held (4) décèle des grains analogues dans les cellules de Purkinje, les cellules radiculaires motrices et pyramidales, grains disposés dans le réticulum du spongioplasma ou dans ses mailles ; il les appelle *neurosomes.*

En 1899, Marinesco (5) colore des coupes de ganglions spinaux humains par le procédé de Romanowski et découvre dans les cellules ganglionnaires des granulations teintes en rouge-rubis ; ces constatations sont confirmées par Marburg (6) et par Bruckner (7) (ganglions sympathiques). Enfin, Olmer (8) décrit des formations analogues dans les cellules du *locus cæruleus*, se colorant par les couleurs basiques, mais retenant aussi la fuchsine acide.

Dans sa monographie déjà citée, Marinesco décrit en détail ces formations granulaires oxyphiles, ou plutôt *oxyneutrophiles*, comme il les appelle. Elles apparaissent en plus grand nombre

(1) Ces constatations ont été mentionnées en 1912 par Levaditi (*Biologica*).
(2) Cf. pour la bibliographie, Marinesco, *La cellule nerveuse*, t. I, *loc. cit.*
(3) Lévi, *Riv di Patholog. nerv. et mentale*, 1896, n° 5.
(4) Held, *Arch. für Anat. und Physiolog.*, 1897.
(5) Marinesco, *Revue neurologique*, 1899, n° 20.
(6) Marburg, *Arb. aus dem Neurolog. Institut*, 1902.
(7) Bruckner, *Structura simpaticului*, thèse de Bucarest, 1901.
(8) Olmer, *Rech. sur les granulations de la cellule nerveuse*, Lyon, 1901.

dans les cellules des ganglions lombaires, se colorent par les colorants acides et neutres (Ehrlich, Biondi) et se montrent de préférence dans les éléments cellulaires les plus volumineux. Parfois, surtout dans les cellules en état de chromatolyse, les granulations oxyneutrophiles apparaissent disposées le long des filaments du réseau achromatique. Le plus souvent elles forment des colonies à l'un des pôles de la cellule et sont mélangées à des grains pigmentaires.

D'après nos constatations, les ganglions rachidiens du singe (*Mac. cynomolgus* et surtout *M. rhesus*) abondent en cellules renfermant des granulations oxyphiles. On peut les mettre en évidence en colorant les coupes par le procédé suivant, méthode de Mann, légèrement modifiée :

Méthode. — Pièces fixées au formol (10 : 100), coupes à la paraffine. Xylol, alcool absolu, eau. On place les coupes dans le bain suivant :

Bleu de méthyle, à	1 p. 100	20 cent. cubes.
Eosine, à	1 p. 100	20 —
Eau distillée		50 —

Séjour pendant deux à trois heures à 38 degrés. Lavage rapide à l'eau. Les coupes sont maintenues jusqu'à ce qu'elles prennent une teinte rubis, dans le bain suivant :

Alcool absolu		30 cent. cubes.
Solution aqueuse de soude, à. .	1 p. 100	20 gouttes.

Lavage rapide à l'alcool absolu. On plonge les coupes, jusqu'à ce qu'elles deviennent nettement bleues, dans le bain suivant :

Alcool absolu	30 cent. cubes.
Acide acétique cristallisable	1 petite goutte.

Lavage à l'alcool absolu, xylol, baume.

Constatations (v. planche XVII).

A l'état normal, un grand nombre de cellules nerveuses des ganglions rachidiens (de préférence lombaires) renferment, chez le singe, des granulations qui se colorent en rouge vif par cette méthode. Les figures 1 et 3 représentent deux cellules de type différent au point de vue de la répartition des granulations.

Fig. 1. — Le noyau (n) est au centre du neurone ; s, cellules satellites, h, hématie. Le cytoplasma, c, renferme un grand nombre de granulations rouges, de volume égal, rondes ou légèrement ovalaires ; ces granulations sont accumulées en amas, en haut et à droite de la cellule.

Fig. 3. — s, cellule satellite ; c, cytoplasma. Les granulations (r) ont une disposition « *en rosace* ». Elles forment des groupes de 4 à 6, sont disposées en cercle et occupent le centre d'une vacuole claire.

Au début du processus de la neuronophagie, les éléments migrateurs, en nombre relativement restreint, envahissent le protoplasma de la cellule. La *figure 5* montre le cytoplasma (p) contenant des granulations oxyphiles, et en l, l' et l'' des leucocytes à noyau lobé ayant pénétré dans ce cytoplasma. *Ces leucocytes sont entourés d'un espace clair et renferment des granulations oxyphiles ayant appartenu à la cellule nerveuse.* Une cellule satellite (à gauche et en bas du vaisseau h) renferme également quelques granulations.

La dégénérescence primitive du neurone se traduit, dans certaines cellules, par un enrichissement du cytoplasma en grains oxyphiles et une affinité marquée du réticulum pour les couleurs acides. La *figure 4* est un exemple de cette modification particulière (n, noyau dégénéré ; p, cytoplasma avec réticulum oxyphile et pénétration des macrophages dans la périphérie du cytoplasma).

La *figure 2* est une belle illustration de la phagocytose des grains oxyphiles par les leucocytes à noyau polymorphe et les mononucléaires ; c, capsule ; l, l', phagocytes ayant englobé des grains acidophiles ; m, fragment de polynucléaire contenant les mêmes grains.

La *figure 6* représente un stade plus avancé du processus. Toute la capsule est remplie de cellules migratrices, en grande majorité des polynucléaires. Certaines de ces cellules ont phagocyté des grains acidophiles. Elles sont emprisonnées dans un réseau à larges mailles, vestige du cytoplasma du neurone ; c, mononucléaire sans granulations ; l, l', l'' polynucléaires ayant englobé des granulations oxyphiles.

La phagocytose de ces granulations est exercée surtout par les mononucléaires dans la cellule représentée par la *figure 7*.

d, reste du cytoplasma avec granulations ; *s*, cellule satellite sans granulations ; *m*, *m'*, *m''*, macrophages ayant phagocyté des grains oxyphiles.

Des stades plus ou moins avancés de la neuronophagie sont représentés par les figures 8, 9 et 10.

Fig. 8. — *p*, reste du cytoplasma neuronique, avec grains oxyphiles ; *m*, *m'*, macrophages ayant phagocyté ces grains.

Fig. 9. — *n*, hématies ; *l*, *l'*, *l''*, polynucléaires ayant englobé des granulations acidophiles ayant appartenu à la cellule nerveuse.

Fig. 10. — *c*, capsule ; *m*, *m*, paquets de grains oxyphiles dans certains des leucocytes qui ont remplacé complètement la cellule nerveuse.

Toutes ces figures montrent de la façon la plus évidente que *dans la destruction de la cellule nerveuse, au niveau des ganglions spinaux, chez le singe atteint de poliomyélite, la véritable neuronophagie intervient activement*. Ce qui prouve qu'il s'agit bien là d'un englobement phagocytaire de particules ayant appartenu à la cellule nerveuse, c'est la présence de granulations oxyphiles dans le protoplasma des phagocytes. Ces granulations appartiennent en propre à la cellule nerveuse et ne sauraient être confondues ni avec les grains éosinophiles, ni avec les granulations neutrophiles des leucocytes. Les premiers sont plus volumineux, les secondes plus fines et plus difficilement colorables. *Si donc on décèle de nombreux grains oxyphiles dans les phagocytes qui envahissent le cytoplasma du neurone, c'est que ces grains proviennent de ce cytoplasma et qu'ils ont été englobés par ces phagocytes*. Il y a neuronophagie véritable, tout tend à le prouver.

Un point reste à élucider, cependant. Si l'origine vasculaire et diapédétique des polynucléaires qui prennent part au processus de la neuronophagie ne laisse aucun doute, il est plus difficile de préciser la nature des macrophages qui interviennent dans ce processus. S'agit-il de mononucléaires du sang, ou de cellules satellites, ou des deux espèces d'éléments cellulaires à la fois ? La quantité parfois considérable de macrophages que l'on observe à l'intérieur de la capsule, véritables nids de mononucléaires ayant remplacé la totalité du neurone (figures 6, 9

et 10, par exemple), nous fait pencher vers cette dernière hypothèse. Certains aspects du processus, tel celui représenté par la figure 7, plaident en faveur de l'intervention des cellules capsulaires (satellites) dans l'acte de la neuronophagie. Mais quelle que soit la force proliférative de ces cellules satellites, il nous semble peu probable qu'elles puissent assurer à elles seules la destruction phagocytaire du neurone. Les macrophages du sang doivent prendre une part active à ce processus de destruction.

LE SANG DE LA POULE
DANS LA SPIRILLOSE EXPÉRIMENTALE

par L. LAUNOY et M. LÉVY BRUHL

(Avec la planche XVIII.)

I

Quelques-unes des modifications sanguines que l'on observe au cours de la spirillose des poules ont été signalées par les premiers auteurs qui ont étudié cette affection : Marchoux et Salimbeni [1], Levaditi [2], mais il n'en a pas encore été fait, du moins à notre connaissance, d'étude systématique et détaillée. C'est cette étude que nous présentons ici.

Conditions expérimentales.

Nous nous sommes servis pour nos expériences de poules adultes du poids de 1 à 2 kilogrammes, en bonne santé apparente.

Dans une première série d'expériences — dont nous donnons d'abord les résultats — nous avons réalisé l'infection au moyen d'un virus provenant du laboratoire de M. Levaditi. Nous injections dans l'épaisseur des muscles pectoraux 0 c. c. 1 à 0 c. c. 5 de sang d'une poule infectée, sang frais ou défibriné et conservé quelques jours à la glacière. Cette quantité s'est toujours montrée suffisante.

Ce virus a évidemment pour origine une infection par l'Argas du Brésil, mais nous ignorons le nombre de passages sur poules qu'il a subis. Quoi qu'il en soit, il produit chez l'animal injecté une affection qui est bénigne, puisque le pourcentage des cas mortels n'a pas dépassé 4 p. 100, et qui présente une constance assez remarquable dans la gravité et l'évolution des phénomènes cliniques et bactériologiques. Le virus est donc d'une part relativement atténué, et d'autre part il peut être considéré comme un virus fixe.

La maladie réalisée dans ces conditions présente les caractères suivants :

Période d'incubation de 48 heures, puis apparition des spirilles dans le sang périphérique. C'est le début de la période de septicémie qui dure 3 à 4 jours. Elle se marque cliniquement par une forte diarrhée, de l'abattement, de l'inappétence, une pâleur marquée de la crête qui est terne et flasque, et une parésie plus ou moins accentuée du train postérieur. Vers le 5e ou 6e jour, les spirilles, dont le nombre a augmenté progressivement dans le sang périphérique, se présentent groupés en agglutinats, plus ou moins volumineux, puis disparaissent brusquement : c'est la crise. L'animal se rétablit rapidement et revient en quelques jours à un état tout à fait normal. Il se trouve immunisé contre un essai de réinfection, comme nous l'avons vérifié souvent.

Nous avons essayé de renforcer ce virus par des passages, mais nos conclusions sont analogues sur ce point à celles de M. Marchoux [3] ; les passages successifs ne renforcent pas le virus; le séjour à la glacière est une cause d'affaiblissement quand on conserve dans le sang le gros amas de fibrine qui se forme au cours de la défibrination. En enlevant cet amas par décantation du sang aussitôt après la défibrination, on obtient un virus dont la virulence se conserve à la glacière pendant au moins un mois. En somme, par une série de passages et de conservation à la glacière, nous avons eu pendant dix-huit mois un virus qui n'a pas sensiblement varié (1).

Technique de l'examen du sang.

Les numérations des éléments figurés étaient faites sur une goutte de sang prélevée à la crête ; nous nous sommes servis de l'hématimètre de Malassez, et comme liquide de dilution du liquide de Marcano.

Le dosage du fer était pratiqué sur 5 cent. cubes de sang carotidien ; en même temps on faisait une numération des hématies dans le même échantillon de sang artériel ; nous

(1) L. Launoy et F. Defaix ont vu, depuis la rédaction de ce mémoire, que le *Sp. gallinarum* peut être conservé à la glacière, dans certaines conditions, *pendant quatre mois au moins*, sans perdre sa virulence.

avons obtenu chaque fois un chiffre très voisin de celui que nous avions trouvé à la crête quelques minutes avant la saignée.

a) *Récolte du sang.* — Incision de 2 à 3 centimètres à la partie supérieure du cou; mise à nu d'une carotide; isolement de celle-ci, ponction avec les précautions aseptiques d'usage au moyen d'un tube effilé; on prélève 6 à 7 cent. cubes de sang; le liquide est transvasé dans un verre à précipité, stérile. Avec une pipette de 1 cent. cube, on transporte 5 cent. cubes de ce sang, dans un matras à destruction; la pipette est ensuite lavée soigneusement avec 2 à 3 cent. cubes d'eau redistillée, de façon à entraîner par hémolyse la matière colorante des globules fixés sur la paroi de la pipette. Le sang de poule bien prélevé ne coagule dans ces conditions que très lentement, on a donc tout le temps voulu pour faire cette petite manipulation; si la prise est mal faite, le sang coagule très vite au contraire, même avant d'être transvasé, la coagulation se faisant en bloc ou bien sous forme de petits caillots mous. Tout sang qui nous a présenté des caillots, même très petits, n'a pas été employé. C'est donc sur le sang total, bien liquide, n'ayant subi aucun début de coagulation que nos dosages ont été effectués.

b) *Dosage du fer.* — Le sang est additionné de 8 cent. cubes d'SO^4H^2 chimiquement pur à 66 degrés (procédé Bertrand); la destruction est faite à chaud sans addition d'acide nitrique; la liqueur claire obtenue est égale à 2 ou 3 cent. cubes; on l'additionne de 30 à 40 cent. cubes d'eau distillée bouillie. Le sel ferrique est réduit par H^2S au bain-marie à l'ébullition. Quand la réduction est totale on chasse H^2S en excès par un fort courant d'acide carbonique, à chaud. On laisse refroidir dans un courant de CO^2, on titre dans le matras même par une solution de permanganate N/100 titrée par l'acide oxalique. Le titre de notre solution de permanganate était vérifié fréquemment.

Une précaution à prendre pour la chasse rapide de H^2S en excès, consiste dans le remplacement de tout le système : bouchon de caoutchouc et tubes abducteur et adducteur des gaz quand on passe de H^2S à CO^2.

L'opération est donc conduite depuis la prise de sang jusques et y compris la titration dans un seul récipient.

La résistance globulaire des hématies était recherchée en laissant tomber une goutte de sang dans 4 cent. cubes de solution chlorurée sodique à taux décroissant.

L'examen morphologique des éléments et l'étude de la formule leucocytaire était fait sur des lames colorées au May-Grünwald-Giemsa, d'après la technique indiquée par Pappenheim : May-Grunwald trois minutes, plus eau distillée trente secondes, laver, plonger dans Giemsa (1 goutte pour 1 cent. cube) douze à quinze minutes, laver, sécher.

Des colorations de contrôle étaient faites avec May-Grünwald simple, hématéine et éosine, triacide, etc...

II

Le sang de la poule à l'état normal.

On trouve à l'état normal des chiffres assez constants. Nous croyons utile de donner ici avec quelques détails les résultats de nos examens personnels.

Hématies.

1° *Nombre.* — Nous avons trouvé des chiffres de globules rouges variant de 2.180.000 à 3.200.000. Le taux moyen est généralement compris entre 2.300.000 et 2.900.000, en moyenne 2.600.000.

Ces chiffres sont relativement faibles, comparés à ceux qui ont été donnés par quelques auteurs, en particulier par Burckhardt [4]. Cet auteur trouve comme moyenne 3.288.000. Il est possible que cette différence tienne, au moins en partie, à ce fait qu'avant de prélever le sang, il produisait l'hyperémie de la crête en la frictionnant avec de l'éther.

2° *Dosage du fer.*

POULES	FER pour 100 cent. cubes de sang.	GLOBULES ROUGES par millimètre cube.
1	0,046	»
2	0,049	»
3	0,046	»
4 *a*	0,038	»
4 *b* (8 jours, après 4 *a*)	0,039	»
5 *a*	0,038	»
5 *b* (8 jours, après 5 *a*)	0,042	»
6	0,047	2.640.000
7	0,043	2.520.000
8	0,044	2.640.000
9	0.056	2.920.000

Ces chiffres indiquent donc une grande stabilité dans la teneur en fer du sang de poule. En effet, à part les cas 4 et 9 qui sont un peu aberrants, la teneur pour les sept autres cas est comprise dans les limites très étroites de : 0,042-0,047; pour ces neuf exemples, la moyenne est de 0,045.

Nous ne connaissons qu'un seul document publié à ce sujet; c'est une analyse de Pelouze, cité par Armand Gautier [5]. Pour Pelouze (1 seul chiffre) le fer serait égal à 0,036 p. 100, donc résultat un peu plus faible que celui que nous avons obtenu.

3° *Résistance globulaire.* — Elle est très élevée chez la poule, par comparaison avec les autres animaux de laboratoire. Nous avons trouvé : début de l'hémolyse à 0,40, hémolyse totale à 0,35.

D'après Costa et Fayet [6], début à 0,46, hémolyse totale à 0,34.

4° *Aspect morphologique.* — Les hématies après étalement sur lame et coloration, se présentent comme des éléments, tous semblables d'aspect et de dimensions, de forme ovale, à noyau central ovalaire, assez volumineux, fortement coloré en violet, à protoplasma homogène, nettement coloré en rose.

Leucocytes.

Nombre. — Nous avons trouvé des chiffres variant entre 25.200 et 56.400, en général compris entre 30.000 et 45.000.

Burckhardt trouve en moyenne 23.500 (12.000 à 46.000). Klieneberger et Carl [7], 35.000 à 60.000.

Aspect morphologique. — Les différentes variétés de globules blancs sont en proportion assez constante; la formule leucocytaire est relativement fixe. Ces variétés sont :

A. — Des *mononucléaires* qu'on peut distinguer d'après leurs dimensions en :

a) Lymphocytes (30 à 50 pour 100 leucocytes), petits éléments arrondis, à gros noyau central fortement coloré, entouré d'une mince bande de protoplasma homogène très légèrement basophile.

b) Des moyens mononucléaires (7 à 23 p. 100), analogues aux lymphocytes, mais un peu plus volumineux.

c) Des grands mononucléaires (0 à 3 p. 100), éléments analogues de plus grandes dimensions, rares à l'état normal.

En outre, on observe des mononucléaires à granulations basophiles (1 à 8 p. 100), à gros noyau arrondi, à granulations rondes très nettement colorées en bleu violacé (*Mastzellen*, de Burckhardt, Klieneberger et Carl).

B. — Des *polynucléaires.* Ils contiennent tous des inclusions; ils se divisent en deux variétés nettement distinctes par la forme de celles-ci. Nous distinguerons donc :

a) Les polynucléaires à bâtonnets, ou à cristalloïdes, suivant plusieurs auteurs (20 à 45 p. 100). Leur noyau, fortement coloré en violet, est divisé en

plusieurs lobes; le corps protoplasmique est rempli de formations ovales, cristalloïdes, fortement colorées en rouge. Le nombre de ces inclusions est considérable; elles remplissent la cellule, recouvrant souvent les noyaux; la plupart du temps elles semblent groupées en deux amas comme suspendues à deux pôles opposés de la cellule.

b) Des polynucléaires à grains ronds (1 à 18 p. 100). Leur noyau présente à peu près les mêmes caractères que celui des polynucléaires à bâtonnets. Le protoplasma contient de petits grains parfaitement arrondis; il se colore par le May-Grunwald, en rouge moins intense que les bâtonnets. Les grains sont habituellement peu nombreux dans la cellule, ils sont espacés les uns des autres et répartis uniformément.

Ces deux variétés de polynucléaires ont été décrites par Kasarinoff [8] sous le nom de polynucléaires pseudo-éosinophiles pour les polynucléaires à bâtonnets, et de polynucléaires éosinophiles vrais pour les polynucléaires à grains ronds. Cet auteur s'appuie sur certains caractères du noyau et des granulations. Nous avons cherché à préciser l'exactitude de ces qualificatifs.

1° *Affinités chromatiques des inclusions.* — Quand on fait agir sur un frottis non fixé les solutions suivantes : éosine dans alcool méthylique (1/100) deux minutes, puis hématoxyline pendant une minute, on obtient une coloration rouge des bâtonnets et des grains. La coloration est rapide, mais l'intensité est inégale pour les deux variétés d'inclusions : les bâtonnets sont nettement plus colorés que les grains; le plasma des éléments reste tout à fait incolore ; les grains en particulier se détachent nettement sur le fond grisâtre de la cellule.

Par comparaison, des leucocytes humains traités de la même façon donnent les résultats suivants : les polynucléaires à granulations neutrophiles se colorent en rose très faible. Les polynucléaires à grains éosinophiles vrais, ont une teinte rouge intense analogue à celle des bâtonnets des polynucléaires du sang de la poule.

La coloration par le May-Grunwald simple, pratiquée de même sur les lames de sang de poule non fixées, donne aux bâtonnets et aux grains une teinte rouge très forte et égale, de même qu'aux granulations des polynucléaires éosinophiles de l'homme.

Après fixation par l'alcool-éther, puis coloration par l'éosine en solution aqueuse à 1/100, les bâtonnets et les grains sont

faiblement colorés en rose alors que les hématies sont fortement colorées par l'éosine.

La même solution d'éosine aqueuse donne les mêmes colorations, mais plus marquées après fixation des éléments par l'alcool méthylique.

La coloration par le triacide d'Ehrlich, après fixation à 110 degrés pendant dix minutes montre les bâtonnets fortement colorés en rose violet et les grains colorés en rose pâle; le plasma des éléments est incolore.

En résumé, les inclusions cristalloïdes après l'application de ces différentes méthodes de fixation et de coloration se montrent nettement éosinophiles. Au contraire, les granulations rondes sont toujours moins fortement colorées que les bâtonnets ; donc leur affinité pour l'éosine est moins intense que celle de ces derniers. On ne peut donc conclure de l'étude chromatique à l'éosinophilie vraie de ces grains si l'on considère les bâtonnets comme pseudo-éosinophiles.

Restent les caractères du noyau. Kasarinoff s'était fondé sur la forme particulière du noyau des éléments à grains ronds pour les rapprocher des éosinophiles de l'homme ; il y retrouvait en effet l'aspect caractéristique des deux lobes réunis par un mince filament, signalé chez l'homme par Jolly. Cette disposition se rencontre, en effet, mais elle est loin d'être la règle; nous l'avons retrouvée dans un élément sur vingt environ, les autres sont formés de deux lobes tout à fait séparés. Dans les polynucléaires à bâtonnets, on trouve à peu près un élément sur dix ayant un noyau trilobé ; les autres bilobés.

Il est difficile, dans ces conditions, de qualifier l'une de ces deux variétés d'éosinophile vraie et l'autre de pseudo-éosinophile. A notre avis, ces deux sortes d'inclusions sont pseudo-éosinophiles, puisque la méthode d'Ehrlich les colore en rose-violet. D'ailleurs, ces dénominations ont peu d'importance, car les deux variétés d'éléments sont, en fait, très nettement distinctes, et il est impossible de les confondre. On ne trouve d'ailleurs pas d'éléments intermédiaires pouvant créer une confusion. Pour ces raisons, nous parlerons ici de polynucléaires pseudo-éosinophiles à bâtonnets et de polynucléaires pseudo-éosinophiles à granulations sphériques.

Nous trouvons comme formule leucocytaire moyenne :

Lymphocytes	44	62 mononucléaires.
Moyens mono	16,5	
Grands mono	1,5	
Polynucléaires à bâtonnets	28,6	38 polynucléaires.
Polynucléaires à grains ronds	6,6	
Basophiles	2,8	

Ces chiffres concordent avec ceux que donnent les auteurs :

ELLERMANN et BANG		KLIENEBERGER et CARL		BURCKHARDT	
Polynucléaires	37	Petits lympho.	51,5	Petits lympho.	48,5
Lymphocytes	40	Grands lympho.	12,3	Grands lympho.	12,8
Grands mono	23	Bâtonnets	29,5	Pseudo-éosinoph.	27,9
		Eosinophiles vrais.	4,5	Eosinoph. vrais	7,9
		Mastzellen	2,2	Mastzellen	2,9

Signalons enfin des *thrombocytes*, éléments ovalaires à noyau fortement coloré, à protoplasma vacuolaire. Nous avons laissé de côté dans cette étude les variations numériques et morphologiques de ces éléments.

III

Le sang de la poule au cours de la spirillose.

Globules rouges.

Nombre. — Si l'on suit les variations du nombre des globules rouges au cours de la maladie, on constate un abaissement progressif extrêmement précoce, puisqu'il est déjà très net au bout de quarante-huit heures (au moment où apparaissent les spirilles dans le sang périphérique). Vers le 5e ou le 6e jour (au moment de la crise), le nombre des globules est tombé à la moitié environ du chiffre primitif. C'est là le point d'*anémie maxima*, et cette chute est suivie d'une augmentation progressive tout aussi rapide, en sorte que le chiffre normal se retrouve entre le 12e et le 15e jour.

Globules rouges.

JOURS de la maladie.	Y	Z	I¹	J¹	L¹	M¹	O¹
Avant l'infection.	2.886.000	2.890.000	2.740.000	2.881.000	2.520.000	2.640.000	2.920.000
Après 2 jours.	2.200.000	2.540.000	2.135.000	2.435.000	»	»	»
3 jours.	1.750.000	2.280.000	1.950.000	2.250.000	»	2.270.000	2 140.000
5 jours.	1.800.000	1.470.000	1.800.000	1.340.090	1.445.000	1.995.000	1.800 000
6 jours.	2.420,000	1.260.000	Saignée.	Saignée.	1.330.000	»	1.820.000
8 jours.	2.830.000	1.530.000	»	»	1.680.000	1.722.000	Saignée.
11 jours.	»	2.130.000	»	»	2.040.000	Saignée.	»
15 jours.	»	2.560.000	»	»	2.420.000	»	»

Dosage du fer — Pratiqué quand l'anémie est à son maximum, il donne des chiffres notablement diminués, mais proportionnellement moins que le nombre des globules. Alors que ce nombre a baissé de près de moitié, la teneur en fer a diminué de 25 à 30 p. 100. Exemples :

POULES	AVANT L'INFECTION		AU 5e JOUR	
	Globules.	Fer.	Globules.	Fer.
I¹	2.740.000	»	1.800.000	0.031
J¹	2.890.000	»	1.340.000	0.034
L¹	2.520.000	0,043	1.445.000	0.033
O¹	2.920.000	0,056	1.800.000	0.044

Si l'on admet que tout le fer du sang est fixé sur les hématies, on trouve pendant l'anémie une valeur globulaire nettement augmentée. Ce fait rapproche l'anémie spirillaire des anémies dites pernicieuses.

Le dosage du fer pratiqué quinze jours après l'infection, montre le retour à la normale.

Résistance globulaire. — Nous n'avons trouvé en pleine anémie qu'une très légère diminution de la résistance globulaire : le début de l'hémolyse se faisait à 0,40 au lieu de 0,35, chiffre normal.

Variations morphologiques. — L'examen du sang à l'état frais, après dilution dans le liquide de Marcano, permet déjà de constater l'apparition d'hématies anormales. On voit en effet à côté des globules rouges normaux, d'autres éléments qui en diffèrent par leurs formes et leurs dimensions. Les uns sont petits et arrondis; d'autres très grands (à peu près le double d'une hématie ordinaire); un certain nombre d'entre eux se présentent avec un gros noyau très réfringent entouré d'un mince protoplasma qui semble très fragile.

L'examen sur lames colorées montre à côté de ces variations de formes et de dimensions une grande diversité dans les réactions colorantes, d'où un aspect très polymorphe (polychromatophilie) surtout marqué du 5e au 8e jour.

On trouve alors à côté des globules normaux un petit nombre de globules altérés, nécrotiques, et — en plus grand nombre — de grands éléments ovalaires, faiblement colorés par l'éosine, d'autres analogues, mais tout à fait incolores, enfin des hématies franchement basophiles, généralement de forme arrondie. Notons également, à ce moment, la présence d'assez nombreux globules un peu plus volumineux que les hématies normales et dont le protoplasma est très fortement éosinophile. Les éléments pauvres en hémoglobine (faiblement acidophiles ou même basophiles) sont des formes jeunes qui marquent les premiers stades de la réparation sanguine. On les rencontre du 3e au 10e jour de la maladie; ils font place progressivement aux éléments normaux et le sang a repris vers le 15e jour son aspect habituel. Cette polychromatophilie, de même que l'augmentation de la valeur globulaire, rapproche l'anémie spirillaire des anémies dites pernicieuses. Mais elle s'en distingue comme nous l'avons démontré par la réparation rapide et complète qui s'établit.

Globules blancs.

Au cours de la maladie, les variations des leucocytes suivent toujours la même marche, fait que l'on peut rapprocher de l'évolution cyclique de l'affection au point de vue bactériologique et clinique (incubation, septicémie, crise). Nous décrirons ces variations en suivant l'ordre chronologique des faits, tels

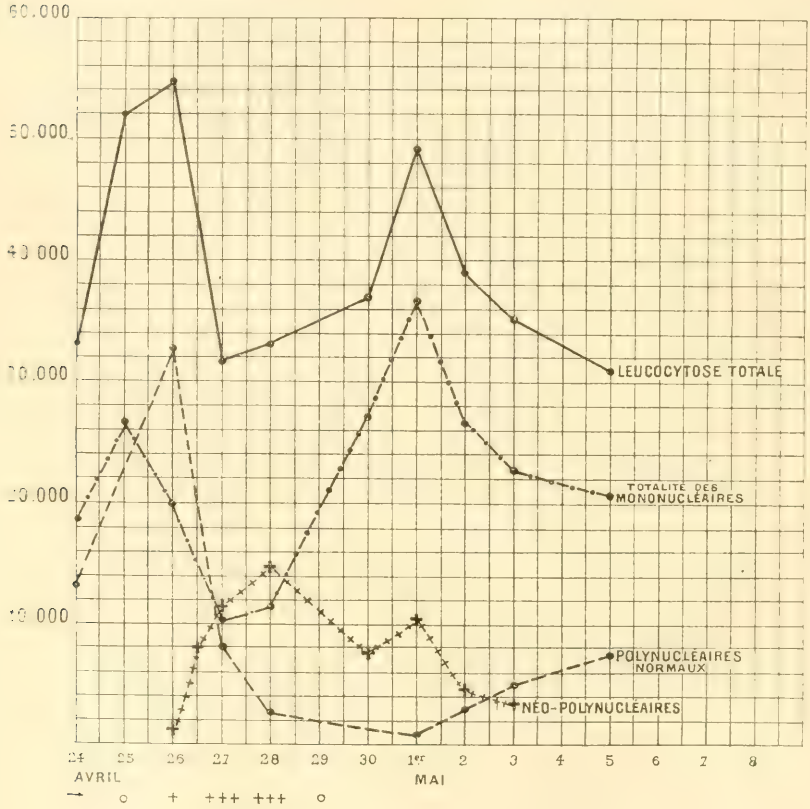
qu'on les constate par un examen journalier d'une poule infectée.

Dès le début, avant même que les spirilles soient apparus dans le sang périphérique, on note une augmentation du nombre des leucocytes, marquant la réaction précoce des organes hémopoiétiques. Cette leucocytose, qui est numériquement peu élevée (50 à 60.000 leucocytes au lieu de 25 à 35.000, chiffre normal), est due à l'augmentation des polynucléaires à bâtonnets, dont le pourcentage atteint 60 à 65 p. 100 au lieu du chiffre normal 35 p. 100 ; ces éléments présentent leur aspect morphologique habituel.

Vers le 2e et 3e jour, au moment où les spirilles apparaissent, la leucocytose polynucléaire continue, mais l'aspect morphologique des éléments s'est modifié. Les bâtonnets sont remplacés par des grains arrondis, volumineux, souvent inégaux dans une même cellule. Ces inclusions présentent exactement les mêmes réactions colorantes que les bâtonnets des polynucléaires normaux et sont nettement distinctes des polynucléaires à grains ronds de la poule normale. Ces leucocytes sont des éléments jeunes de nouvelle formation analogues à ceux qu'on rencontre dans la moelle osseuse de l'embryon (Jolly) ; Kasarinoff les a signalés au cours de certaines intoxications expérimentales de la poule. Nous les désignons sous le nom de néopolynucléaires, terme commode qui évite toute confusion. Ces éléments ne persistent sous cet aspect que durant deux ou trois jours ; peu à peu, les inclusions des polynucléaires reprennent leur aspect cristalloïde normal. On peut voir, durant cette période, d'assez nombreux éléments, contenant à la fois des grains et des formations cristalloïdes. Ce sont les formes de passage de l'élément jeune à l'élément adulte. Ces formes de passage elles-mêmes disparaissent en quelques jours et on ne retrouve que des polynucléaires d'aspect normal.

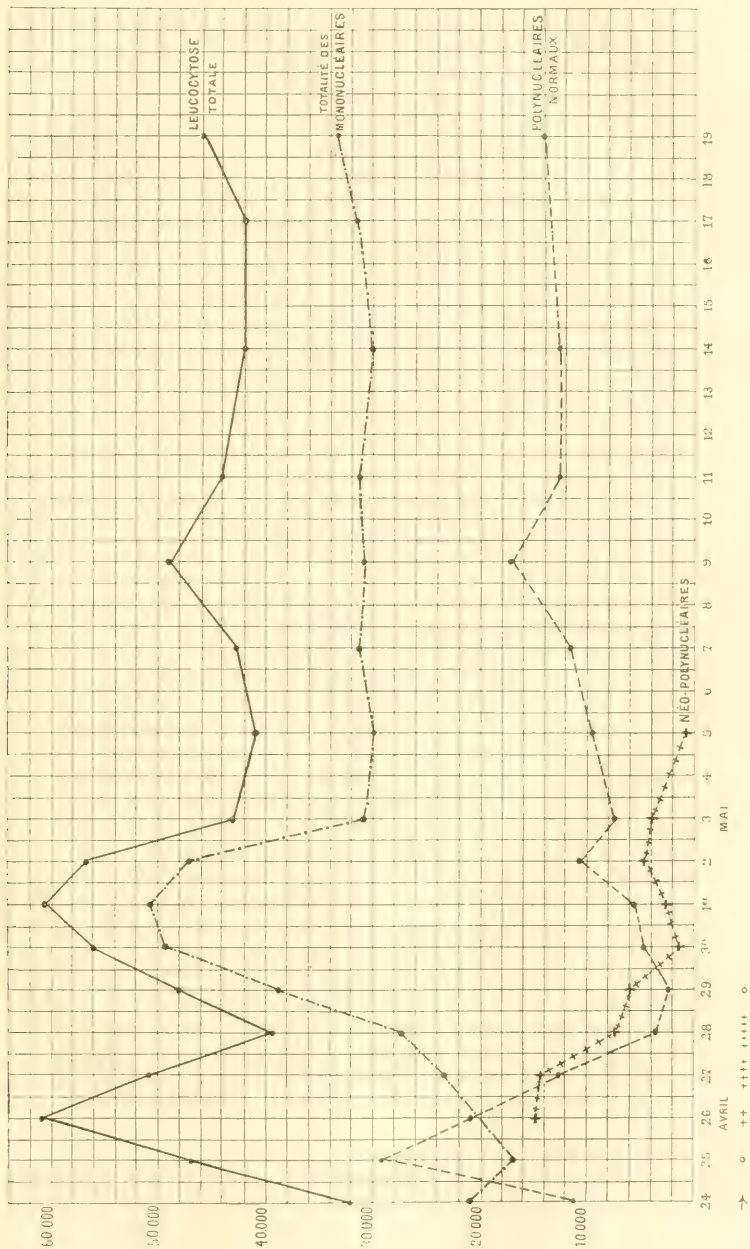
Après la poussée de leucocytose polynucléaire, on observe une courte période de leucopénie relative (le nombre des leucocytes retombe à la normale ou même un peu au-dessous) ; elle coïncide habituellement avec les débuts de la crise (spirilles groupés en gros agglutinats) et se place vers le 6e jour de la maladie. Aussitôt après commence une seconde poussée de leucocytose, mais cette fois c'est une leucocytose mononu-

cléaire. Numériquement, elle est plus considérable que la leucocytose polynucléaire du début; le nombre des leucocytes s'élève à 70.000 environ, et sa durée est sensiblement plus longue puisqu'on peut la retrouver dans certains cas quinze



Poule Y. — Spirillose.

jours ou même trois semaines après la disparition des spirilles. La mononucléose est surtout marquée dans les jours qui suivent la crise ; l'établissement de la formule leucocytaire montre un pourcentage de mononucléaires atteignant 85 ou 90 p. 100 au lieu de 50 à 60 p. 100, chiffre normal. D'une façon générale, c'est une mononucléose à éléments moyens, on trouve également de nombreux lymphocytes reliés aux précédents par tous les intermédiaires, et en outre de grands éléments à proto-



Poule Z. — Spirillose.

plasma homogène plus ou moins basophile. On trouve en outre quelques rares mononucléaires à granulations pseudo-éosinophiles (myélocytes et promyélocytes des élèves de Pappenheim).

Les variations des leucocytes basophiles sont faibles et inconstantes.

Comme résultats éloignés, on trouve soit le retour à des chiffres tout à fait normaux, soit un état de leucocytose numériquement assez faible, avec une formule tantôt normale tantôt nettement mononucléaire.

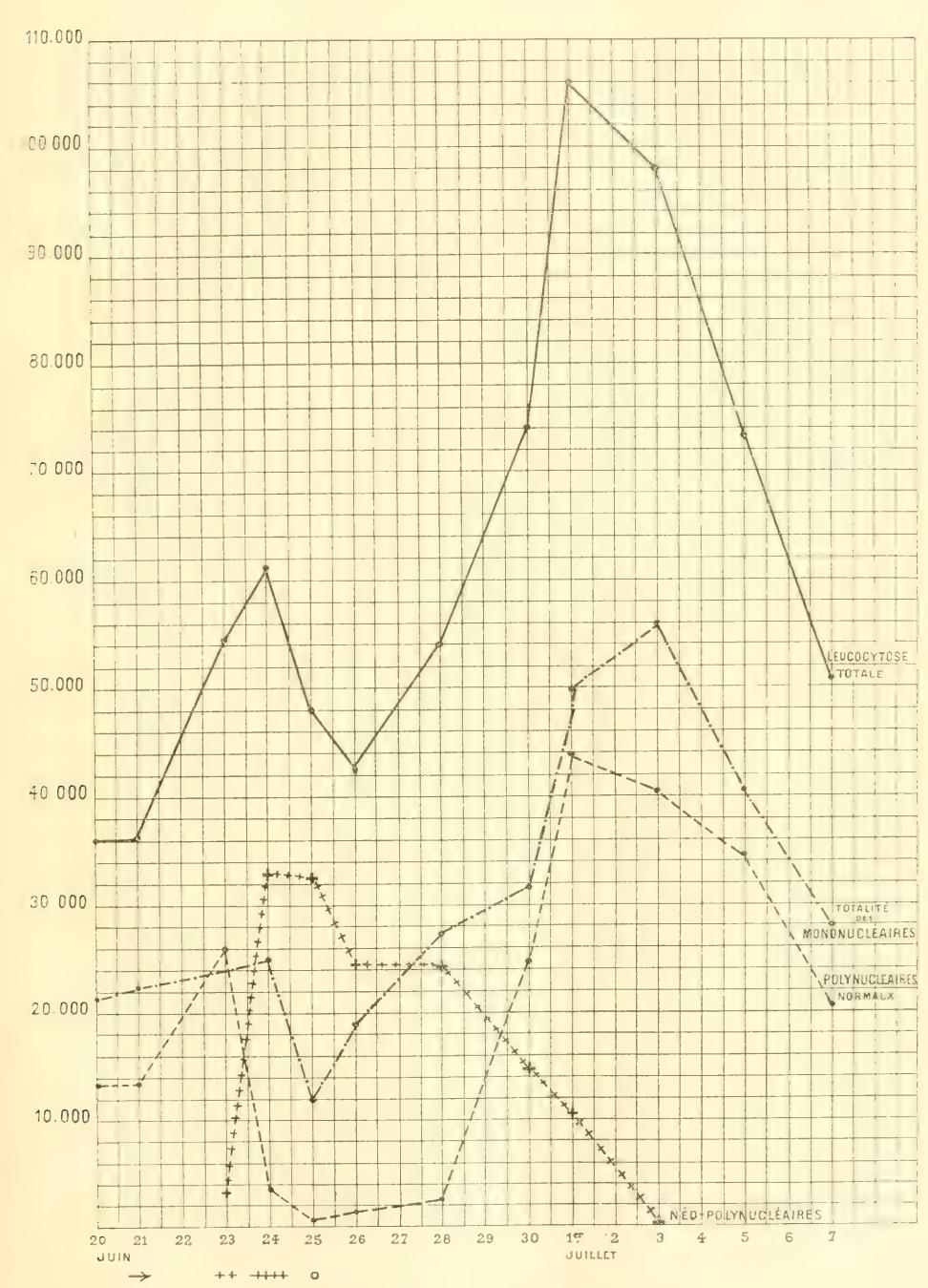
Ces modifications leucocytaires peuvent être rapprochées, dans leur évolution, de celles décrites par Léger, dans le surra expérimental de la souris blanche [9].

IV

Etude d'un virus de premier passage (virus argas).

Nous avons recherché si le syndrome hématologique, d'une constance et d'une régularité frappantes dans les conditions expérimentales que nous avons définies, se retrouvait avec les mêmes caractères quand on réalisait chez des animaux tout à fait comparables une maladie plus grave au moyen d'un virus plus actif. Nous avons eu, grâce à l'obligeance de M. Marchoux, un virus provenant d'une poule infectée avec le sang d'un animal piqué par un argas spirillifère. C'est donc un virus de premier passage; nous le désignons sous le nom de « virus argas ».

Ce virus s'est montré sensiblement plus actif que le premier : le pourcentage des cas mortels s'est élevé à 30 p. 100 pour les poules adultes. Cette virulence n'est pas en rapport avec une septicémie numériquement plus forte. Souvent même, au contraire, la septicémie est relativement peu marquée. Cliniquement, on observe les mêmes symptômes qu'avec le premier virus : diarrhée, abattement et parésie, pâleur de la crête; mais ces phénomènes sont plus marqués et l'état général paraît plus atteint. Il semble qu'il se produise une intoxication grave qui caractérise l'évolution clinique, et qui est marquée dès le début. Quand l'animal succombe, c'est vers le 6e jour, après



Poule R¹. — Spirillose (Virus argas).

disparition des spirilles ; mais habituellement, la crise, caractérisée par une agglutination nette des spirilles, est suivie d'une convalescence rapide et d'un retour en quelques jours à l'état normal. L'immunité complète est établie contre un nouvel essai d'infection.

Au point de vue hématologique, nous retrouvons, au cours de l'infection ainsi réalisée, une anémie de même allure que dans notre première série d'expériences, mais d'apparition encore plus précoce et de grande intensité. Malgré l'atteinte grave de l'état général, la réparation sanguine se fait très rapidement : elle se marque par la même apparition d'éléments jeunes, d'où le même aspect polymorphe du sang étalé sur lames et coloré. Exemples :

POULES	AVANT l'infection.	3e JOUR	5e JOUR	6e JOUR	8e JOUR	12e JOUR
R^1	3.120.000	2.270.009	1.960.000	2.235.000	2.700.000	2.950.000
G^2	2.420.000	»	»	1.370.000	»	2.280.000

Quant aux variations leucocytaires, elles sont analogues à celles que nous avons observées au cours de notre première série d'expériences, mais la leucocytose mononucléaire post-infectieuse est plus prononcée (80.000), elle peut être légèrement prolongée.

Dans d'autres cas, elle est masquée par une leucocytose polynucléaire concomitante, en sorte que le pourcentage des mononucléaires ne dépasse pas 60 p. 100 au lieu de 80 à 90 p. 100, chiffre que l'on trouve habituellement après la crise.

V

Poules splénectomisées.

Au cours de recherches sur le rôle de la rate, dans la résistance à l'infection et l'établissement de l'immunité dans la spirillose, nous avons étudié les réactions sanguines de quelques

poules dératées, comparées à des poules normales infectées dans les mêmes conditions.

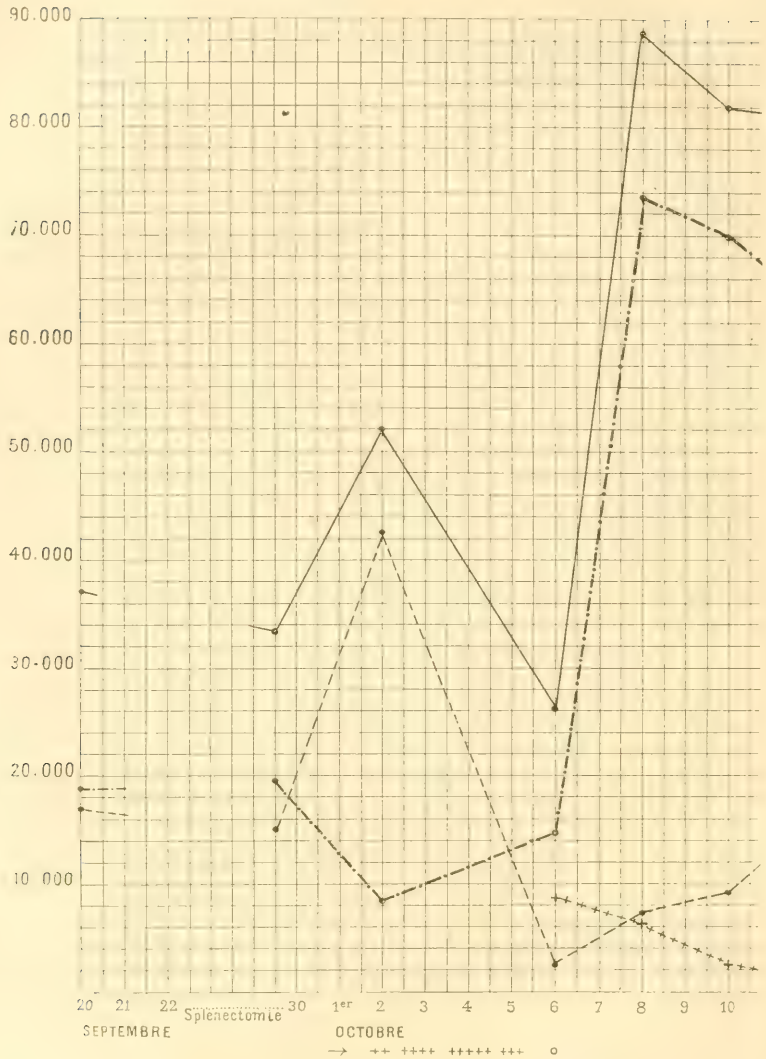
Nous nous sommes assurés d'abord que la splénectomie ne produisait pas par elle-même de modifications sensibles de l'état du sang.

ESPÈCES GLOBULAIRES	POULE A²		POULE B²	
	Avant splénectomie.	8 jours après.	Avant splénectomie.	8 jours après.
Hématies	2.930.000	2.880.000	2.570.000	2.430.000
Leucocytes	37.000	33.400	40.800	39.400
Lymphocytes	36	37,5	27	38,5
Moyens mononucléaires	14	15 »	15	10 »
Grands mononucléaires	0	0 »	0	0 »
Polynucléaires à bâtonnets	40	30 »	49	40 »
Polynucl. à grains ronds	8	15 »	7	7 »
Basophiles	2	2,5	2	4,5

Il ne se produit pas non plus de modifications appréciables au bout d'un temps plus long (six semaines). Exemples : poule K 2, splénectomisée le 13 octobre.

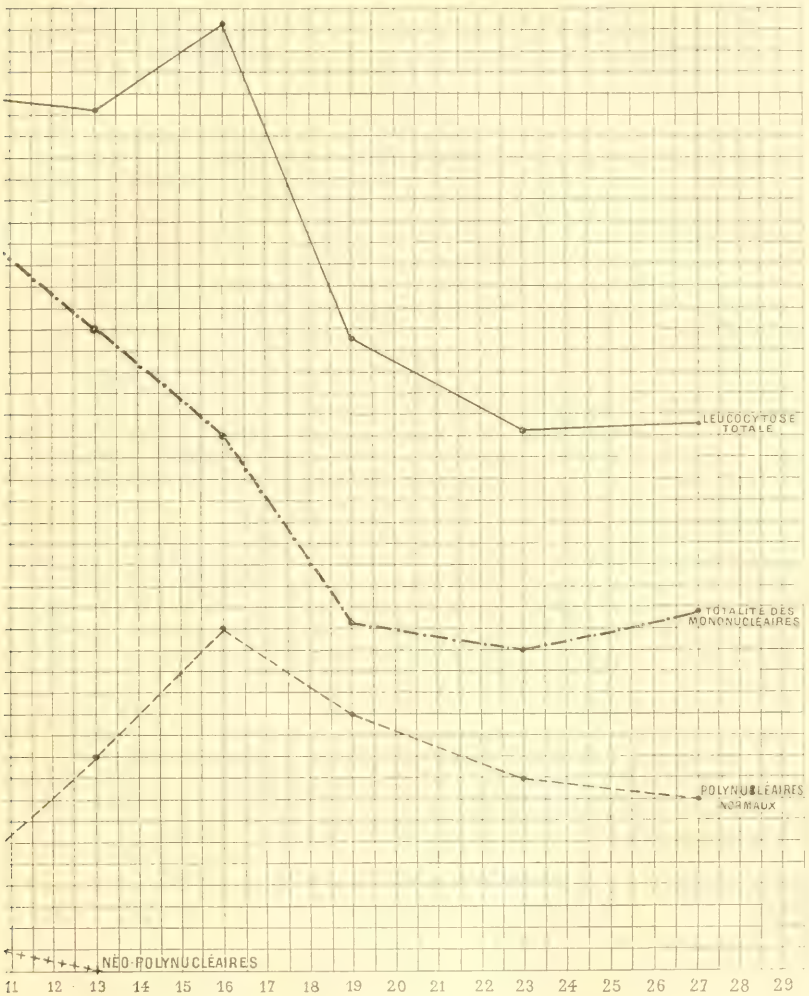
EXAMEN LE :	HÉMATIES	LEUCOCYTES	LYMPHOCYTES	MOYENS MONONUCLÉAIRES	GRANDS MONONUCLÉAIRES	BATONNETS	GRAINS RONDS	BASOPHILES
14 nov.	2.630.000	48.000	42	14 »	1	30	10	3 »
25 nov.	2.480.000	51,600	45	14,5	0	26	10	3,5

Chez ces poules splénectomisées, l'évolution de la maladie est, au point de vue bactériologique et clinique, un peu différente de ce qu'elle est chez une poule normale. Nous donnons dans un autre travail le détail de cette étude expérimentale [10]. Voici ce que nous avons observé au point de vue hématologique :

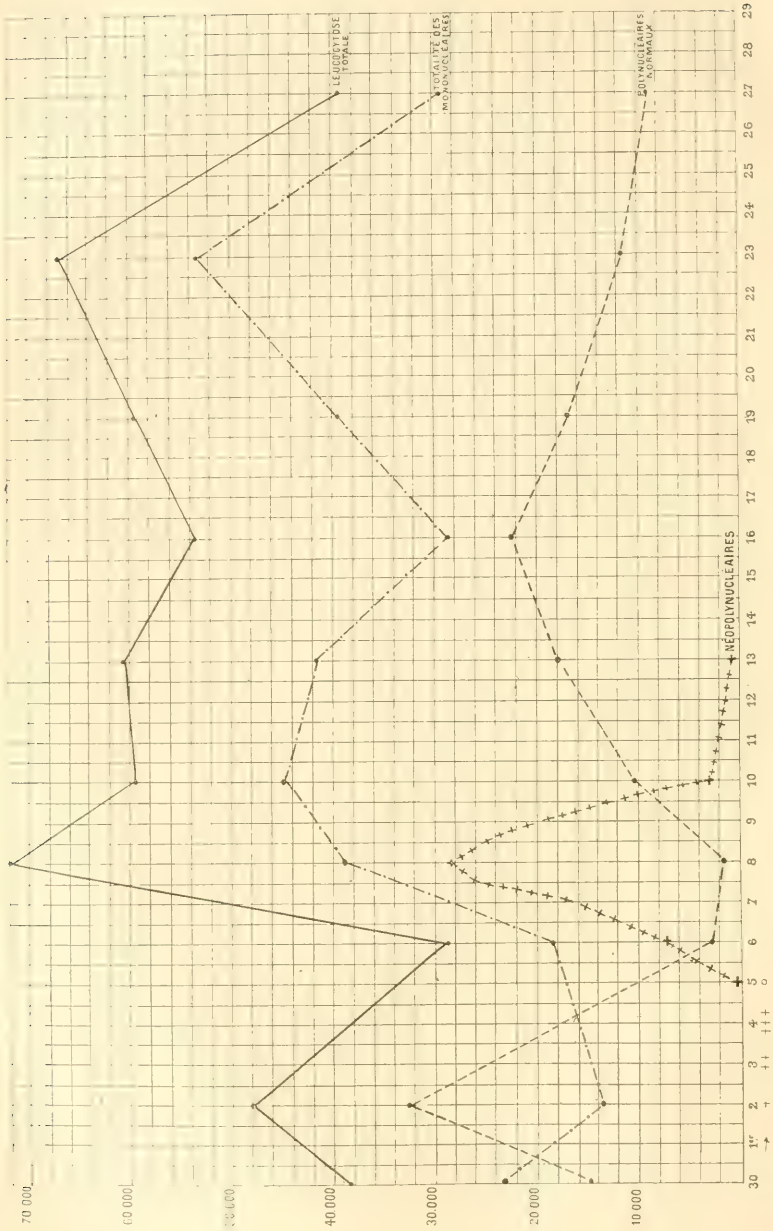


Poule A³. Splénectomie spirillose.

L'anémie n'est pas modifiée dans son allure ni dans son intensité. La réparation sanguine se fait aussi bien et aussi vite que chez les témoins, ce qui confirme le fait signalé par Jolly [11] que la rate chez l'oiseau adulte ne joue plus aucun rôle hémopoiétique. Exemples :



POULES	AVANT splénectomie	AVANT l'infection.	6e JOUR	8e JOUR	10e JOUR	12e JOUR	16e JOUR
A² dératée.	2.930.000	2.880.000	1.860.000	2.200.000	2.360.000	2.550.000	2.700.000
C² témoin de A².	»	2.590.000	1.760.000	2.080.000	»	»	2.400.000
B² dératée.	2.570.000	2.430.000	1.900.000	2.200.000	2.430.000	»	2.440.000



Poule C², spirillose (*témoin de A²*).

En ce qui concerne les variations leucocytaires, nous avons retrouvé chez nos poules splénectomisées l'évolution caractéristique que nous avons signalée chez la poule normale. La poussée de néo-polynucléaires, en particulier, se produit très nettement, ce qui prouve bien que la rate n'intervient pas dans la production de ces éléments granuleux jeunes. La seule différence dans les réactions leucocytaires porte sur la leucocytose mononucléaire post-infectieuse qui est plus marquée et un peu plus prolongée que chez les témoins. On peut voir persister une légère leucocytose numérique, mais habituellement la formule leucocytaire est redevenue normale au bout de quinze jours ou trois semaines.

Conclusions.

Nous montrons dans ce travail que :

1° L'infection de la poule adulte par le *Spirochæta gallinarum* détermine chez cet animal *une anémie très rapide et très marquée, le nombre des globules pouvant baisser de moitié en cinq jours.* Ce phénomène est, au point de vue hématologique, le plus caractéristique. Par son intensité et certains caractères de l'anémie (polychromatophilie, valeur globulaire augmentée) il rapproche la spirillose des poules des anémies dites pernicieuses ; mais cette affection s'en écarte par la réparation sanguine rapide et complète en une dizaine de jours après la crise.

2° Cette anémie et sa réparation s'accompagnent de variations leucocytaires à évolution cyclique constante.

Nous rapprochons dans le tableau ci-après les phénomènes hématologiques des stades cliniques correspondants.

Ces résultats s'appliquent essentiellement à nos expériences avec le virus fixe ; mais l'infection par un virus de premier passage (virus argas) qui produit une maladie un peu plus grave, réalise un syndrome hématologique tout à fait analogue.

JOURS de la maladie.	ÉVOLUTION clinique.	GLOBULES ROUGES	GLOBULES BLANCS
1 à 2	Incubation.	Début de l'anémie.	Leucocytose polynucléaire à bâtonnets.
3 à 5	Période d'état.	Chute globulaire progressive.	Leucocytose à néopolynucléaires.
5 à 6	Crise.	Anémie maximum (50 p. 100).	Leucopénie.
6 à 10	Convalescence.	Réparation globulaire.	Leucocytose mononucléaire.
»	Guérison.	État normal.	État normal ou quelquefois légère leucocytose avec formule normale. Quelquefois mononucléose prolongée.

3° La rate ne paraît pas intervenir dans la production de ces modifications sanguines. Son ablation n'apporte à ce point de vue aucun changement dans l'évolution hématologique de la maladie telle que nous l'avons schématisée ci-dessus.

*
* *

BIBLIOGRAPHIE

1. Marchoux et Salimbeni. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1903
2. Levaditi. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1904.
3. Marchoux. — *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1907, p. 298.
4. Burckhardt (J.-L.). — *Zeitschrift fur Immunitätsforschung, Originale*, 1912, t. XIV.
5. Gautier (Armand). — *Traité de chimie biologique.*
6. Costa et Fayet. — Réunion biologique de Marseille, 20 juin 1911, in *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1911, t. LXXX, p. 33.
7. Klieneberger et Carl. — *Die Blut-Morphologie der Laboratoriumsthiere*, Leipzig, 1912.
8. Kasarinoff. — *Folia Hæmatologica*, 1910, t. X, p. 391.
9. Léger (M.). — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1909, p. 70.
10. L. Launoy et M. Lévy Bruhl. — *C. R. Soc. Biol.*, 21 fév. 1914, p. 298.
11. Jolly. — *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1911, t. LXXX, p. 239.

PLANCHE XVIII

Explication des figures.

(Grossissement obtenu avec obj. 1/12 Zeiss, oculaire 2 Zeiss, tirage du tube — 150).

1-10, Eléments normaux. — 1, globules rouges; 2, 3 et 4, lymphocytes et moyens mononucléaires; 5, 6, 7, polynucléaires à bâtonnets; 8, polynucléaire à grains ronds; 9, mononucléaire basophile; 10, thrombocytes.

11, Aspect des globules rouges dans l'anémie spirillaire. — En *a*, hématoses normales; *b*, globules nécrotiques; *c*, éléments anhémoglobiques à protoplasma basophile; *d*, globules pauvres en pigment hémoglobique; *e*, globule sphérique à noyau très réfringent, à protoplasma très éosinophile (plus que ne l'indique la figure).

12, Différents aspects des leucocytes néo-polynucléaires.

13, Formes de passage des néo-polynucléaires aux polynucléaires à bâtonnets, apparaissant après la crise.

14, Myélocyte.

15, Grands mononucléaires à protoplasma basophile, trouvés au moment de la poussée mononucléaire post-infectieuse.

16, Agglutinat de spirilles.

TRAITEMENT VACCINOTHÉRAPIQUE DE LA FIÈVRE TYPHOIDE

par E. BOINET,

Professeur de Clinique médicale, Médecin en chef des Hôpitaux,
Correspondant national de l'Académie de médecine.

Ces essais de vaccinothérapie ont été faits avec le *virus sensibilisé de Besredka*, dont l'emploi paraissait indiqué en raison de sa nature, de sa composition, de la persistance de la vitalité des bacilles typhiques. Ces dernières conditions permettaient d'espérer une immunisation plus active et plus rapide, la formation d'une plus grande quantité d'anticorps, l'augmentation plus considérable du pouvoir bactéricide du sérum et de sa teneur en sensibilisatrice spécifique.

I

Doses. — Cette vaccinothérapie a été d'abord employée, de préférence au moment le plus rapproché du début de la maladie, déjà confirmée par un séro-diagnostic positif, dans 25 cas de fièvre typhoïde (1).

Innocuité. — Chez tous ces malades, le virus sensibilisé, utilisé en trois à six injections sous-cutanées, à la dose globale maximum de 11 cent. cubes, n'a déterminé aucun accident local, aucune complication générale.

Effets thérapeutiques. — L'amélioration de l'état général, la diminution de la prostration et de la torpeur, une sensation de bien-être surviennent après la 2e ou la 3e injection, généra-

(1) L'histoire de 28 autres typhiques traités postérieurement est résumée dans la seconde partie de ce mémoire.

lement de 24 à 36 heures plus tard, comme le montre le tableau synoptique de nos 25 observations.

La chute de la température est parfois observée après cette sensation d'euphorie ; elle s'est produite le jour de la troisième injection dans les observations IV, V ; le lendemain de la dernière injection de virus sensibilisé dans les observations I, III, IX, XII, XIV, XV, XVIII, XX, XXII, XXIV, XXV ; le surlendemain dans les observations II, VI, XVII, XXI, XXIII ; 2 jours après l'injection dans l'observation XI ; 4 jours (observation XVI), 5 jours plus tard (observations VIII, X, XIII) et plus irrégulièrement (observation XV).

Cette vaccinothérapie a été employée habituellement aux doses successives de 1, 2, 3, 4 cent. cubes, représentant 9 à 11 cent. cubes de virus sensibilisé injectés en 4 à 6 jours consécutifs, au moment le plus rapproché du début de la maladie.

Elle abrège la durée de la fièvre typhoïde, diminue la phase des oscillations stationnaires, favorise l'évolution plus rapide de cette affection, quand elle est traitée à temps.

Cette action thérapeutique est surtout nette quand les injections sont faites dans les 6 à 10 premiers jours de l'infection ; la fièvre typhoïde est alors plus courte, moins intense, moins grave et moins sujette aux rechutes. La durée de la fièvre typhoïde est d'autant plus abrégée que l'emploi de la vaccinothérapie a été plus rapproché du début de la maladie et a été fait à assez fortes doses. Ainsi, dans l'observation VI, où la vaccinothérapie a été pratiquée dès le cinquième jour et a été portée à 10 cent. cubes, la fièvre typhoïde n'a duré que 17 jours. Une évolution aussi rapide a été obtenue dans l'observation VII, où une injection de 2 cent. cubes a été faite les 8e et 9e jours. La durée de la fièvre typhoïde n'a été que de 18 jours dans l'observation XV, où la vaccinothérapie à dose moyenne (5 cent. cubes) fut instituée le 5e jour, et dans l'observation XVII, où la première injection fut faite le 7e jour. La guérison de la fièvre typhoïde est survenue au 19e jour dans l'observation V, où on commença, dès le 8e jour, l'injection des 7 cent. cubes de virus sensibilisé ainsi que dans l'observation XVIII. Elle a été observée le 20e jour dans l'observation X, où l'injection de 6 cent. cubes de virus sensibilisé fut commencée le 6e jour. Elle se

produisit le 21e jour dans l'observation I, où on injecta 6 cent. cubes de virus sensibilisé, et dans l'observation II, où la vaccinothérapie à la dose de 4 cent. cubes fut faite à partir du 9e jour. L'évolution de la fièvre typhoïde a duré 24 jours dans l'observation IX, où 7 cent. cubes de virus sensibilisé furent injectés à partir du 7e jour. Une durée de 25 jours a été notée dans les observations III, IV, XIV, où les injections de 6, 8, 9 cent. cubes de virus sensibilisé ne furent pratiquées que tardivement (16, 14, 11 jours après le début de la fièvre typhoïde). La durée de l'évolution a atteint 27 jours dans l'observation XII, où cependant 8 cent. cubes de virus sensibilisé furent injectés à dater du 8e jour, et dans l'observation XXI, où la vaccinothérapie fut employée à la même époque, mais à dose trop faible (2 cent. cubes). Dans l'observation XI, la fièvre typhoïde a persisté 28 jours, malgré les injections de 8 cent. cubes de virus sensibilisé faites dès le 7e jour; elle a atteint 31 jours dans l'observation VIII, où 8 cent. cubes ont été inoculés tardivement, du 19e au 22e jour, et 32 jours dans l'observation XX.

Complications. — Ainsi, non seulement cette vaccinothérapie abrège la durée et atténue la gravité de la fièvre typhoïde, mais elle tend à diminuer l'étendue et la profondeur des ulcérations typhiques des plaques de Peyer et à favoriser leur cicatrisation. Cependant, des hémorragies intestinales se sont produites dans l'observation XXI, du 16e au 20e jour de la maladie où la vaccinothérapie consista dans l'injection de 1 cent. cube de virus sensibilisé le 8e et le 11e jour. La guérison arriva le 30e jour. Dans l'observation XXI, où des injections de 2 cent. cubes de virus sensibilisé furent faites aux 13e, 14e et 15e jours, des hémorragies intestinales apparurent les 25e, 28e et 29e jours, une perforation intestinale suivie de péritonite aiguë survint le 48e jour, et le malade succomba le 56e jour. Une perforation intestinale non précédée d'hémorragie a déterminé une péritonite aiguë mortelle dans l'observation XXII, où 9 cent. cubes de vaccin furent injectés tardivement, à partir du 16e jour.

Une rechute bénigne de très courte durée a été notée dans les observations XVI, XXI, XV, XIV, XI et n'a guère consisté qu'en une recrudescence passagère de température, parfois pro-

TABLEAU SYNOPTIQUE. — **Doses et effets thérapeutiques du virus sensibilisé de Besredka.**

OBSERVATIONS	JOURS DU DÉBUT et dates des injections.	NOMBRE	DOSES TOTALES	PREMIER abaissement thermique.	RETOUR à la température normale après l'injection.	DURÉE de la maladie.
I.	15e, 16e, 17e	3 à 2 cent. cubes.	6 cent. cubes.	Lendemain.	4 jours.	21 jours.
II.	9e, 10e	2 à 2 cent. cubes.	4 cent. cubes.	Surlendemain.	11 jours.	21 jours.
III.	16e, 18e, 19e	3 à 2 cent. cubes.	6 cent. cubes.	Lendemain.	6 jours.	25 jours.
IV.	14e, 15e, 16e, 17e	4 à 2 cent. cubes.	8 cent. cubes.	3e jour.	7 jours.	25 jours.
V.	8e, 9e, 10e	3 { 2 à 2 cent. cubes. 1 à 3 cent. cubes.	7 cent. cubes.	3e jour.	8 jours.	19 jours.
VI.	5e, 6e, 7e, 8e, 9e	5 à 2 cent. cubes.	10 cent. cubes.	2e jour.	7 jours.	17 jours.
VII.	8e, 9e	2 à 2 cent. cubes.	4 cent. cubes.	2e jour.	8 jours.	17 jours.
VIII.	19e, 20e, 21e, 22e	4 à 2 cent. cubes.	8 cent. cubes.	5e jour.	8 jours.	31 jours.
IX.	6e, 7e, 8e, 9e, 10e, 11e, 12e	6 { 5 à 1 cent. cube. 1 à 2 cent. cubes.	7 cent. cubes.	3e jour.	11 jours.	24 jours.
X.	6e, 7e, 8e	3 à 2 cent. cubes.	6 cent. cubes.	5e jour.	7 jours.	20 jours.
XI.	7e, 8e, 9e, 10e	4 à 2 cent. cubes.	8 cent. cubes.	2e jour.	18 jours.	28 jours.
XII.	8e, 9e, 10, 11e	4 à 2 cent. cubes.	8 cent. cubes.	Lendemain.	17 jours.	27 jours.
XIII.	16e, 17e, 18e	3 à 2 cent. cubes.	6 cent. cubes.	5e jour.	22 jours.	41 jours.
XIV.	11e, 12e, 13e, 14e	3 { 2 cent. cubes. 3 cent. cubes. 4 cent. cubes.	9 cent. cubes.	Lendemain.	15 jours.	25 jours.
XV.	5e, 6e	2 { 2 cent. cubes. 3 cent. cubes.	5 cent. cubes.	Lendemain.	11 jours.	18 jours.
XVI.	13e, 14e, 15e, 16e	4 à 2 cent. cubes.	8 cent. cubes.	4e jour.	27 jours.	55 jours.
XVII.	7e, 9e, 10e, 11e	4 { 3 à 1 cent. cube. 1 à 2 cent. cubes.	5 cent. cubes.	Lendemain.	7 jours.	18 jours.
XVIII.	15e, 17e	2 à 1 cent. cube.	2 cent. cubes.	Lendemain.	2 jours.	19 jours.
XIX.	7e	1 cent. cube.	1 cent. cube.	Aucun.	38 jours.	45 jours.
XX.	10e, 11e, 12e, 13e, 14e	5 { 2 à 1 cent. cube. 1 à 2 cent. cubes. 1 à 3 cent. cubes.	10 cent. cubes.	Lendemain.	17 jours.	32 jours.
XXI.	8e, 11e	2 à 1 cent. cube.	2 cent. cubes.	2e jour.	15 jours.	27 jours.
XXII.	16e, 17e, 18e, 19e	4 { 1 à 1 cent. cube. 1 à 2 cent. cubes. 2 à 3 cent. cubes.	9 cent. cubes.	Lendemain.	*Décès par perforation intestinale.*	29 jours.
XXIII.	13e, 14e, 15e	2 à 3 cent. cubes.	6 cent. cubes.	2e jour.	*Décès par péritonite.*	56 jours.
XXIV.	10e, 11e, 12e	3 { 2 à 1 cent. cube. 1 à 2 cent. cubes.	4 cent. cubes.	Lendemain.	*Décès (forme ataxo-adynamique).*	19 jours.
XXV.	7e, 9e	2 à 1 cent. cube.	2 cent. cubes.	Lendemain.	*Décès par septico-pyohémie.*	57 jours.

voquée par des imprudences de régime. Nous n'avons observé dans aucun cas de signes de cholécystite.

Indications et contre-indications. — Il convient de n'appliquer cette vaccinothérapie que lorsque les résultats du sérodiagnostic ou de l'hémoculture sont positifs, car elle est contre-indiquée dans la fièvre tuberculeuse et dans la typho-bacillose.

Il y a tout avantage à associer à cette vaccinothérapie le traitement classique de la fièvre typhoïde, l'usage méthodique des bains à 28 degrés pendant quinze minutes, renouvelés toutes les trois heures, lorsque la température dépasse 39 degrés.

L'administration de trop fortes doses peut provoquer, d'après Netter (1), des ruptures de la rate, des hémorragies intestinales, une poussée bacillaire iléo-cæcale, faisant croire à une appendicite et une cholécystite passagère. Il ne faut employer que des doses faibles ou moyennes dans les formes graves ou tardivement traitées et chez les enfants. Il nous a semblé parfois avantageux de rapprocher les injections et de les faire soit quotidiennement, soit tous les 2 à 3 jours, en élevant progressivement les doses, si elles sont bien supportées.

Mode d'action. — Cette vaccinothérapie paraît agir en favorisant la production d'une abondante quantité d'anticorps et l'augmentation considérable du pouvoir bactériolytique dans les humeurs des sujets traités ; elle augmente le pouvoir bactéricide du sérum de ces typhoïdiques et sa teneur en sensibilisatrice spécifique (2).

Obs. I. — *Fièvre typhoïde, guérison 4 jours après 3 injections de 2 cent. cubes de virus sensibilisé de Besredka.*

P... (Albert), âgé de vingt-neuf ans, cuisinier, entre, le 15 janvier 1913, dans le service de clinique médicale de l'Hôtel-Dieu, salle Ducros, lit 2.

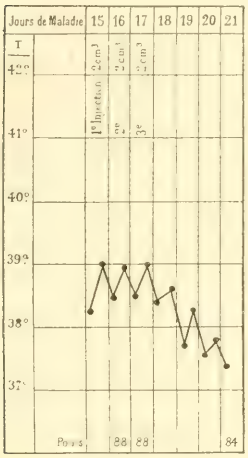
Depuis quinze jours, il éprouve un malaise vague, une lassitude générale, de l'inappétence, de l'anorexie, une fièvre légère augmentant peu à peu, une céphalée violente; il a des épistaxis, des cauchemars, quelques vomissements. A son entrée à l'Hôtel-Dieu, la langue est saburrale, sèche, trémulante; il n'existe pas d'angine; le ventre est légèrement météorisé; le malade a perdu tout appétit, il se plaint de quelques coliques. On trouve de la dou-

(1) *Société médicale des Hôpitaux*, 11 juillet 1913.

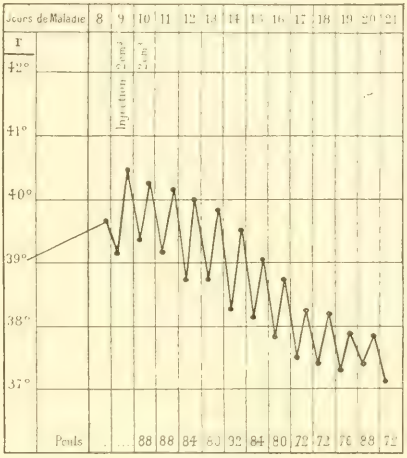
(2) Ardin-Delteil, L. Nègre et M. Reynaud, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 22 février 1913, p. 37.

leur à la pression, quelques gargouillements dans la fosse iliaque droite, de très nombreuses taches rosées lenticulaires, une rate volumineuse. La diarrhée a une odeur fétide. Il existe une légère congestion de la base des poumons. La séro-réaction de Widal est positive à 1/30.

On fait pendant 3 jours une injection de 2 cent. cubes de virus sensibilisé de Besredka. La température est revenue à la normale 4 jours après la troisième injection. La guérison a été rapide, elle est survenue au 23e jour.



Obs. I.



Obs. II.

Obs. II. — *Fièvre typhoïde guérie au 21e jour à la suite de 2 injections de virus sensibilisé de Besredka.*

G... (Louis), âgé de dix-neuf ans, maréchal, né à Bourdet (Deux-Sèvres), habitant Marseille depuis le 1er décembre 1912, buvant ordinairement de l'eau filtrée, est atteint de fièvre typhoïde qui l'oblige à entrer, salle Ducros, lit 12, dans le service de clinique médicale de l'Hôtel-Dieu.

Il s'agit d'une forme assez grave de fièvre typhoïde avec violents maux de tête, saignements de nez, langue saburrale, gargouillement dans la fosse iliaque droite, sans diarrhée, taches rosées, rate hypertrophiée descendant un peu au-dessous du rebord des fausses côtes.

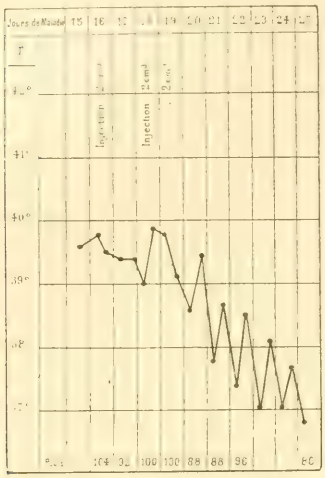
L'amélioration survient le surlendemain de la deuxième injection de 2 cent. cubes de virus sensibilisé de Besredka, et va en s'accentuant rapidement. La période des oscillations stationnaires est abrégée.

La guérison est obtenue dix jours après la seconde injection, au 21e jour de la maladie.

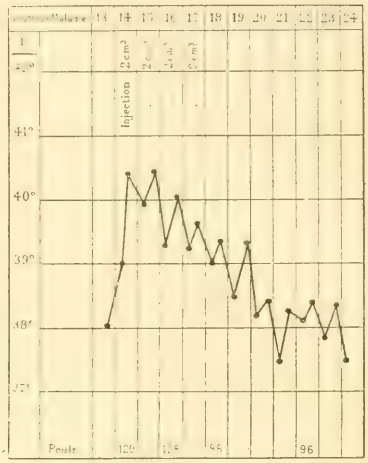
Obs. III. — *Fièvre typhoïde rapidement guérie après trois injections de 2 cent. cubes de virus de Besredka.*

B... (Angélo), entre dans mon service de clinique médicale de l'Hôtel-Dieu, salle Ducros, pour une fièvre typhoïde à évolution classique dont le début paraît dater de 15 jours. Une injection de 2 cent. cubes de virus sensibilisé de Besredka est faite les 16e, 18e et 19e jours. La chute de la température

se fait progressivement, et cinq jours après la dernière injection, la guérison était acquise.



Obs. III.



Obs. IV.

Obs. IV. — *Fièvre typhoïde traitée par 4 injections de 2 cent. cubes de virus sensibilisé de Besredka. Guérison.*

C..., cuisinier, âgé de vingt-trois ans, entre salle Ducros, lit 5, dans le service de clinique médicale de l'Hôtel-Dieu, pour une fièvre typhoïde contractée au bout de 3 mois de séjour à Marseille.

Histoire de la maladie. — Le malade traine depuis 13 jours; il tousse, il a un frisson assez violent, une fièvre élevée; il se couche. La langue est saburrale. Il a quelques nausées et il accuse des épistaxis avant son entrée à l'hôpital.

A notre premier examen, le malade est somnolent, il transpire abondamment.

Appareil digestif. — On note de l'anorexie, de l'inappétence; la langue est sèche, trémulante, il existe de la constipation, l'abdomen est ballonné, peu douloureux; on constate du gargouillement dans la fosse iliaque droite. La rate est hypertrophiée; on compte de nombreuses taches rosées lenticulaires.

Appareil respiratoire — On entend à l'auscultation quelques râles disséminés de bronchite.

Appareil circulatoire. — Les bruits du cœur sont sourds, le pouls est rapide, la température élevée.

La séro-réaction est positive au centième.

On pratique pendant 4 jours de suite une injection de 2 cent. cubes de vaccin de Besredka. L'amélioration est rapide, la chute de température se produit promptement; la période des oscillations stationnaires est abrégée.

La guérison survient 9 jours après la dernière injection, au 25e jour de la maladie.

Obs. V. — *Fièvre typhoïde avec séro-diagnostic positif à 1/100, traitée par trois injections de virus sensibilisé de Besredka. Guérison rapide.*

L... (Jules), âgé de vingt ans, chauffeur d'auto, entre le 10 février 1913 dans le service de clinique de l'Hôtel-Dieu, salle Ducros, lit 1.

Antécédents personnels. — Il n'a jamais été malade ; il habite Marseille depuis trois mois.

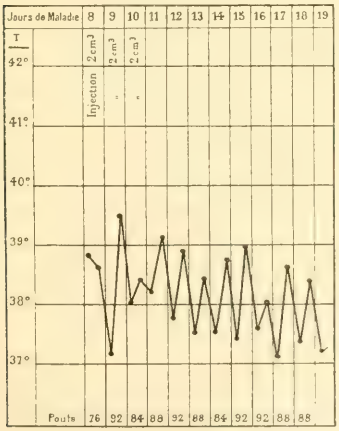
Histoire de la maladie. — Le début remonte au 1er février. Le malade a éprouvé de la lassitude générale, des frissons, du mal de tête, de la courbature ; il a eu des épistaxis, de la constipation et il est obligé de s'aliter le 4.

Examen clinique. Appareil digestif. — Le malade a de l'anorexie, quelques nausées, la langue est humide, saburrale ; il n'y a pas d'angine de Duguet ; l'abdomen est souple, un peu météorisé ; on note quelques taches rosées lenticulaires. La rate est perceptible à la palpation. Il existe du gargouillement dans la fosse iliaque droite. Les urines sont foncées, sans albumine. Le malade se plaint de céphalée, d'insomnie ; le pouls est rapide. Le séro-diagnostic est positif à 1/100. L'état général est assez bon. On pratique trois injections quotidiennes de virus sensibilisé de Besredka à la dose de :

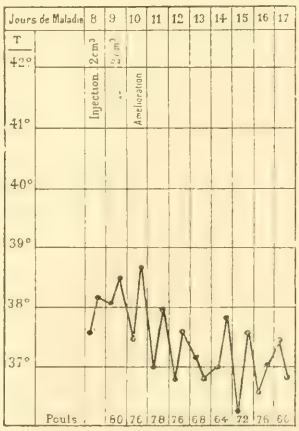
3 cent. cubes, le 8e jour de la maladie.
2 cent. cubes, le 9e jour de la maladie.
2 cent. cubes, le 10e jour.

L'amélioration est progressive et rapide.

La température tombe à la normale le 19e jour de la maladie, neuf jours après la dernière injection.



Obs. V.



Obs. VI.

Obs. VI. — *Fièvre typhoïde avec séro-diagnostic positif, uniquement traitée par cinq injections de 2 cent. cubes de virus sensibilisé de Besredka. Guérison rapide avec période des oscillations stationnaires considérablement diminuées neuf jours après la dernière injection.*

D... (Domingo), Espagnol, âgé de vingt-trois ans, habitant Marseille depuis huit mois, entre dans le service de clinique de l'Hôte-Dieu, salle Ducros, lit 2, le 11 décembre 1912 dans un état typhique marqué avec langue rouge,

anorexie, maux de tête. Il existe des taches rosées avec gargouillement dans la fosse iliaque droite. La rate n'est pas hypertrophiée. Le 13, les taches rosées deviennent plus nombreuses, la langue est sèche. Le séro-diagnostic est positif.

Une injection quotidienne de virus sensibilisé de Besredka est faite les 11, 12, 13, 14, 15 décembre, à partir du 5e jour de la maladie.

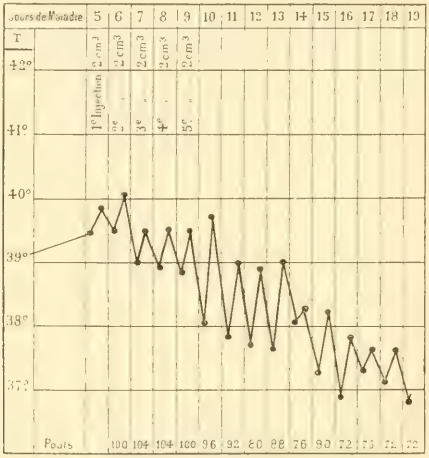
Le 17, les taches rosées sont nombreuses.

Le 18, la langue est nette ; l'amélioration est marquée six jours après la dernière injection.

Le 22, au 16e jour de la maladie, nous notons une très grande amélioration. Le surlendemain, la guérison est obtenue.

Les cinq injections de virus sensibilisé de Besredka, faites à la dose de 2 cent. cubes au début de la fièvre typhoïde, vers le 5e jour de la maladie, ont abrégé considérablement la période des oscillations stationnaires et la durée de cette infection éberthienne qui était guérie le 19e jour.

Cette observation montre que la vaccinothérapie par le virus sensibilisé agit d'autant mieux et d'autant plus vite qu'il est appliqué plus tôt, à une période plus voisine du début de la fièvre typhoïde.



Obs. VII.

Obs. VII. — *Fièvre typhoïde avec séro-diagnostic positif, traitée au 8e jour par une injection de 2 cent. cubes de virus sensibilisé de Besredka, renouvelée le lendemain. Amélioration au bout de vingt-quatre heures et guérison rapide une semaine plus tard.*

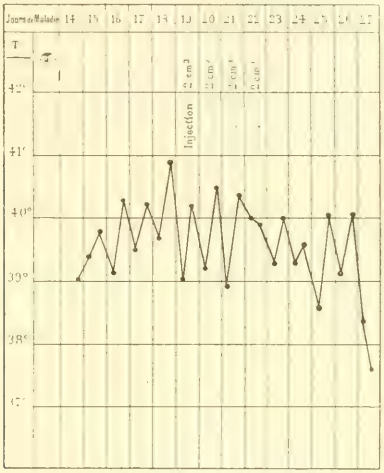
Une jeune fille de vingt et un ans entre le 19 décembre 1913 dans mon service de clinique médicale de l'Hôtel-Dieu, salle Garnier, lit 5, pour une fièvre typhoïde au 8e jour de son évolution. Il existe des taches rosées, du gargouillement dans la fosse iliaque droite. Le séro-diagnostic est positif.

Une injection sous-cutanée de 2 cent. cubes de virus sensibilisé de Besredka est pratiquée les 8e et 9e jours de la maladie ; l'amélioration s'affirme le lendemain. La température tombe à la normale quatre jours après la seconde injection pour se relever à 37,8 et 37,6 les deux jours suivants. La

guérison arrive le 17e jour de la maladie, huit jours après l'injection de virus sensibilisé.

Obs. VIII. — *Fièvre typhoïde guérie après quatre injections de virus sensibilisé de Besredka, pratiquées les* 19e, 20e, 21e *et* 22e *jours de la maladie.*

C... (Marie), âgée de vingt et un ans, ménagère, est prise depuis le 1er décembre 1912 de lassitude générale, d'anorexie progressive, de diarrhée, de métrorragies assez abondantes, de fièvre élevée.



Obs. VIII.

Elle entre le 14 dans le service de clinique de l'Hôtel-Dieu, avec tous les symptômes d'une fièvre typhoïde. On constate des taches rosées, du gargouillement dans la fosse iliaque droite. La séro-réaction est positive.

On pratique quatre injections de 2 cent. cubes de virus sensibilisé de Besredka les 19e, 20e, 21e, 22e jours après le début de la maladie. Une amélioration notable survient après la deuxième injection. Le lendemain, la langue est nette.

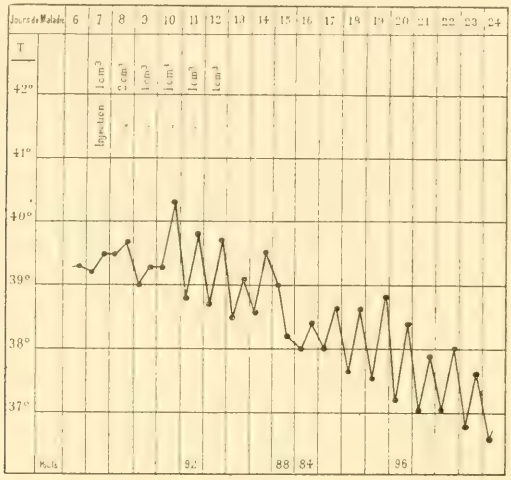
L'amélioration s'accentue considérablement le 26, quatre jours après la quatrième injection. La guérison survient rapidement après une chute brusque de 40 à 37,6, cinq jours après la dernière injection.

Obs. IX. — *Fièvre typhoïde grave avec séro-diagnostic positif traitée par six injections de virus sensibilisé de Besredka. Guérison.*

M... (Joseph), âgé de vingt ans, navigateur, entre le 8 janvier dans le service de clinique de l'Hôtel-Dieu, salle Ducros, lit 34, pour une fièvre typhoïde grave.

Il raconte que depuis une vingtaine de jours il est fatigué et perd progressivement ses forces. Il est obligé de quitter son travail, cinq jours avant son entrée à l'Hôtel-Dieu. Le 3 janvier, il éprouve un frisson assez violent et s'alite.

A notre premier examen, à l'Hôtel-Dieu, le malade est assez prostré ; il se plaint d'anorexie ; la langue est saburrale, fuligineuse ; on constate une rougeur diffuse du pharynx, du ballonnement de l'abdomen qui est sensible à la pression. Il existe des taches rosées lenticulaires, discrètes et du gargouillement dans la fosse iliaque droite. Le foie est normal, la rate est perceptible sous le rebord costal, à la palpation et à la percussion. La diarrhée est légère, les urines sont rares, ont une couleur acajou et sont riches en pigment. Le cœur est normal, le pouls rapide. Le malade se plaint de céphalée, d'insomnie, de cauchemars.



Obs. IX.

Le 11 janvier 1913, la séro-réaction est positive à 1/50 et partielle à 1/100 le 18 janvier, elle devient positive au 1/100.

Six injections de virus sensibilisé de Besredka, représentant une dose de 7 cent. cubes, faites du 6e au 12e jour de la maladie, ont encore abrégé la période des oscillations stationnaires et ont amené une rapide amélioration d'une forme grave, neuf jours après la dernière injection et le retour à une température normale, trois jours plus tard.

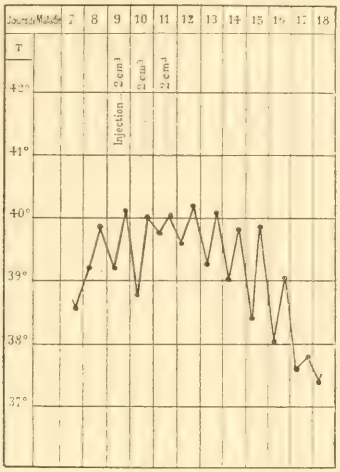
Obs. X. — *Fièvre typhoïde guérie huit jours après la troisième injection de 2 cent. cubes de virus sensibilisé de Besredka.*

C... (Zavério), Italien, garçon de restaurant, entre dans notre service de clinique médicale le 26 novembre 1913 pour une fièvre typhoïde au début. Elle se confirme cliniquement par l'apparition d'épistaxis, de taches rosées, de gargouillement dans la fosse iliaque droite, de diarrhée.

Le séro-diagnostic de Widal est positif à 1/20, 1/50 et reste négatif à 1/100.

Trois injections de 2 cent. cubes de virus sensibilisé de Besredka sont faites, à partir du 11e jour de la maladie, les 4, 5, 6 décembre, le lendemain du jour où la température atteignait 40 degrés. Cinq jours après la dernière injection la température tombait à 39 degrés pour descendre le lendemain à 37,8 et le surlendemain à la normale.

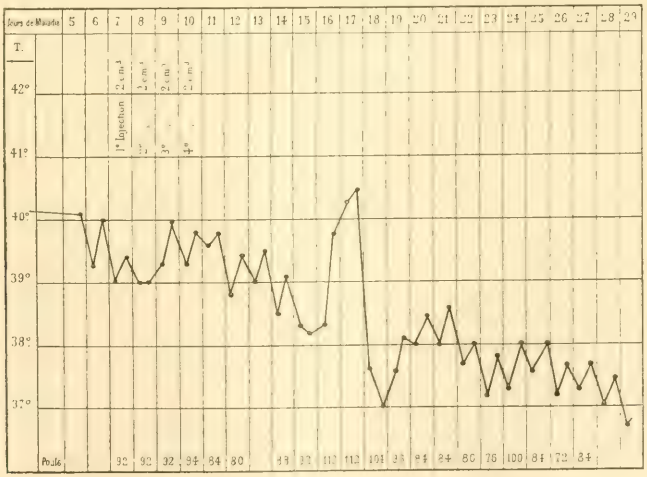
Ce cas est donc intéressant pour la prompte amélioration, la défervescence rapide, la courte durée de la période des oscillations stationnaires aboutissant à la guérison le 20e jour de la maladie.



Obs. X.

Obs. XI. — *Fièvre typhoïde. Guérison après quatre injections de virus sensibilisé de Besredka.*

Ce jeune homme, âgé d'une vingtaine d'années, entre au 5e jour d'une fièvre typhoïde classique confirmée par la séro-réaction positive. On pratique une injection de 2 cent. cubes de virus sensibilisé de Besredka, les 7e, 8e, 9e et 10e jours.



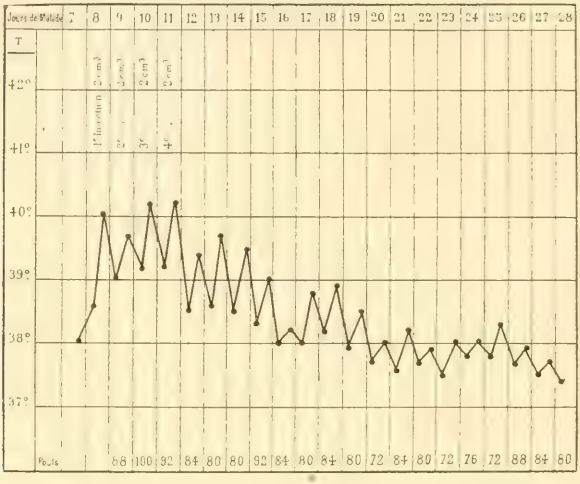
Obs. XI.

Une amélioration notable se produit après la première et la deuxième injection et la température rectale tombe de 40 à 39 degrés.

Le lendemain de la quatrième injection, le 17 décembre, on constate des taches rosées; la langue est moins saburrale et moins trémulante, la rate est hypertrophiée, le ventre est ballonné.

Le 23 décembre, 17e jour de la maladie, des épistaxis se produisent et le thermomètre monte à 40°4 le matin et 40°5 le soir pour retomber le lendemain à 37 degrés. Une petite rechute se produit et le 27e jour de la maladie l'amélioration est considérable; la guérison survient le lendemain.

Cette observation montre les bons effets de la vaccinothérapie curative quand elle est pratiquée dès les premiers jours de la maladie.



Obs. XII.

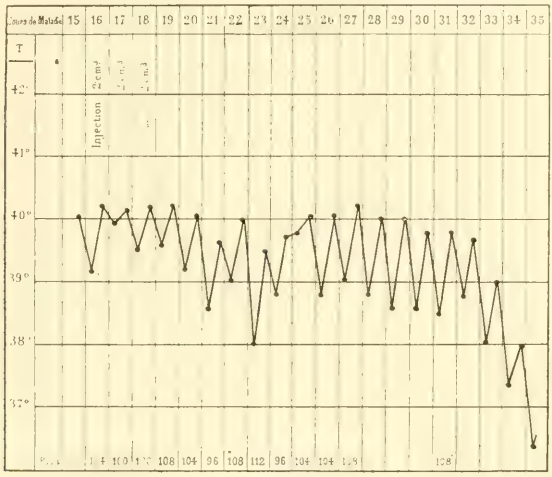
Obs. XII. — *Fièvre typhoïde traitée par quatre injections de 2 cent. cubes de virus sensibilisé de Besredka. Guérison.*

B... (Chaffrey), entre le 11 décembre 1912 dans notre service de clinique médicale de l'Hôtel-Dieu, salle Ducros, lit 19, pour une fièvre typhoïde au début. Le malade est prostré, abattu; il a des épistaxis et présente du gargouillement dans la fosse iliaque droite. Les taches rosées n'apparaissent que le 17. La séro-réaction pour l'Eberth est positive à 1/30; elle est négative pour le paratyphique A et B.

Une injection de 2 cent. cubes de virus sensibilisé de Besredka est pratiquée dès le 8e jour de la maladie, les 12, 13, 14 et 15 décembre; le lendemain de la quatrième injection, la température qui était de 40°2 la veille tombe à 38°5 dans la matinée. Une amélioration considérable survient trois jours après la dernière injection, au 14e jour. La période des oscillations stationnaires est abrégée. La température est à 37°8, neuf jours après la dernière injection; elle reste à ce niveau pendant quelques jours et ne redevient complètement normale qu'une semaine plus tard, au 28e jour de la maladie.

Obs. XIII. — *Fièvre typhoïde compliquée de congestion pulmonaire traitée à partir du 16e jour par trois injections de 2 cent. cubes de virus sensibilisé de Besredka. Guérison lente.*

M. B... (Michel) entre dans le service de clinique médicale, salle Ducros, lit 16, le 19 décembre 1912, pour une fièvre typhoïde datant de quinze jours et caractérisée par des épistaxis, des taches rosées lenticulaires, du gargouillement dans la fosse iliaque droite et un séro-diagnostic positif.



Obs. XIII.

Une injection de virus sensibilisé de 2 cent. cubes est faite les 16e, 17e et 18e jours de la maladie. Un abaissement marqué de la température est noté trois jours après la dernière injection. La température tombe de 40 degrés à 38°5; le surlendemain la chute de température est de 2 degrés (de 40 à 38 degrés).

Des complications pulmonaires rendent la guérison tardive.

Obs. XIV. — *Fièvre typhoïde traitée par d'assez fortes doses (11 cent. cubes) de virus sensibilisé de Besredka. Guérison.*

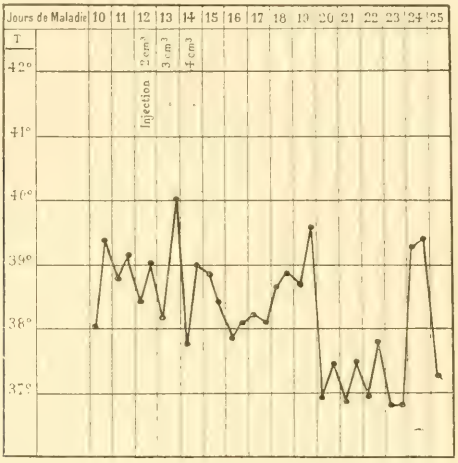
A... entre le 9 mars 1913, salle Ducros, lit 8, dans le service, au 10e jour d'une fièvre typhoïde contractée après cinq mois de séjour à Marseille.

La maladie a débuté, le 1er mars, par de la lassitude, de la céphalée, de la courbature, de la fièvre avec transpiration. Le malade est obligé de s'aliter; la langue est pâteuse, la température élevée; dans les premiers jours de la maladie, il existe de la constipation, de l'insomnie, des cauchemars, de légères épistaxis.

A son entrée à l'hôpital, le malade se plaint de perte d'appétit, d'une soif intense, de constipation. La langue est sèche, saburrale, l'abdomen est souple, météorisé, la rate est perceptible à la palpation. On note l'existence

de taches rosées lenticulaires et du gargouillement dans la fosse iliaque droite. Le séro-diagnostic est positif à 1/100.

Nous injectons du virus sensibilisé de Besredka à la dose de 2 cent. cubes les 11e et 12e jours de la maladie, de 3 cent. cubes le 13e jour et de 4 cent. cubes le 14e jour. Ces doses sont très bien supportées et n'entraînent aucun inconvénient.



Obs. XIV.

Après l'injection de 3 cent. cubes la température tombe de 40 à 37°8 ; elle remonte à 39 malgré l'injection de 4 cent. cubes pour descendre le lendemain à 38°5 et le surlendemain à 37°8. On note le 19e et le 24e jour deux ascensions brusques à 39°6 et 39°4 tenant à une imprudence de régime et suivies brusquement du retour de la température à la normale et de guérison.

Obs. XV. — *Fièvre typhoïde traitée dès le début par d'assez fortes injections (5 cent. cubes) de virus sensibilisé de Besredka. Guérison rapide, au 17e jour de la maladie.*

M..., âgé de vingt-six ans, menuisier, entre le 20 mars 1913, dans le service de clinique médicale de l'Hôtel-Dieu, salle Ducros, lit 32, pour une fièvre typhoïde dont le début remonterait à 4 jours. Il a été atteint brusquement de frissons, de fièvre avec sensation de chaleur, de céphalée, de courbature l'obligeant à rester chez lui et à s'aliter le lendemain. Trois jours après, il entre à l'hôpital. La prostration est peu accusée, les yeux sont brillants, les pommettes rouges. La langue est humide, saburrale, rouge à la pointe. Il existe de l'anorexie sans vomissements. L'abdomen est souple, légèrement météorisé; on note quelques taches rosées lenticulaires, du gargouillement dans la fosse iliaque droite. La rate est perceptible à la palpation. Le pouls est rapide, dicrote. La température est à 40. La séro-réaction est positive à 1/50 et à 1/100.

Le malade raconte qu'il aurait eu une fièvre typhoïde dans son enfance, sans en fournir la preuve.

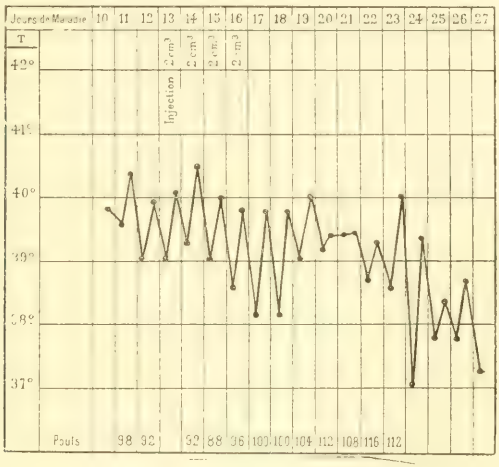
Nous faisons une injection de virus sensibilisé de Besredka à la dose de

2 cent. cubes le 5e jour, et de 3 cent. cubes le 6e jour de la maladie. Le lendemain, la température tombait à 37°6 le matin et à 37°6 le soir et le surlendemain, à 36°6 le matin et à 37 le soir. Après une ascension légère à 38, la guérison survint rapidement, le 17e jour.

Ce cas prouve encore les bons effets de la vaccinothérapie à des doses élevées, quand elles sont injectées dès le début de la fièvre typhoïde.

Obs. XVI. — *Fièvre typhoïde traitée par 4 injections de 2 cent. cubes de virus sensibilisé de Besredka. Convalescence tardive.*

Mlle M... (Madeleine), journalière, âgée de vingt ans, entre le 2 mars 1913, pour une fièvre typhoïde datant de dix jours, dans le service de clinique médicale, salle Garnier, lit 2. Le début de la maladie a été progressif et s'est manifesté par des frissons, de la céphalée, de la courbature et un malaise général; plus tard surviennent de l'anorexie, de la diarrhée, et des métrorragies assez abondantes.



Obs. XVI.

A son entrée à l'hôpital, le facies est rouge, vultueux. La prostration est marquée, la soif intense, la diarrhée fétide. Il existe une perte complète d'appétit. La langue est saburrale, rouge sur les bords, rôtie. Les lèvres sont fuligineuses, l'abdomen météorisé, un peu douloureux. On constate des taches rosées, du gargouillement dans la fosse iliaque droite, une augmentation de volume de la rate. On trouve des signes de bronchite légère des deux côtés. La température est élevée et la malade se plaint de céphalée, d'insomnie, de cauchemars; son état général est assez grave.

La séro-réaction de Widal est positive à 1/100.

Une injection quotidienne de 2 cent. cubes de virus sensibilisé de Besredka est pratiquée les 13e, 14e, 15e et 16e jours de la maladie. La température vespérale qui atteignait 40°5 après la 2e injection, s'abaisse faiblement après la 3e et la 4e, tandis que la température prise à neuf heures du matin tombe à 38°2. Les jours suivants, la courbe est irrégulière, en raison des complications

broncho-pulmonaires, et la convalescence ne s'établit que 24 jours après la dernière injection.

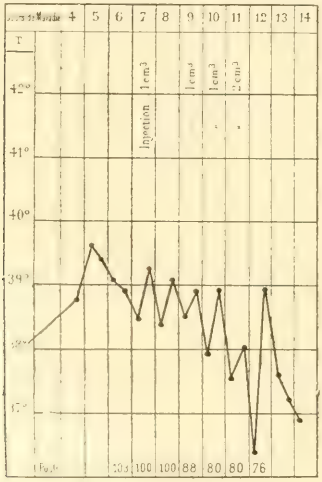
Ce fait montre le peu d'effet du virus sensibilisé de Besredka sur les complications broncho-pulmonaires.

L'action de la vaccinothérapie aurait été plus nette et plus active, si la première injection n'avait pas été aussi tardive.

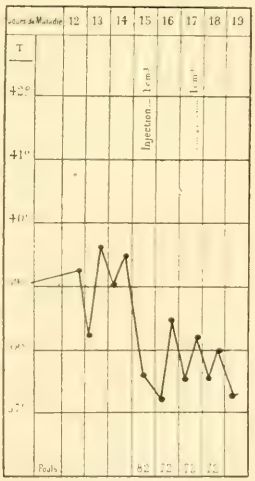
Obs. XVII. — *Fièvre typhoïde rapidement guérie à la suite de 4 injections de virus sensibilisé de Besredka.*

R... (Antoine) entre le 4 mai 1913 dans notre service de clinique médicale, salle Ducros, lit 31, pour une fièvre typhoïde classique avec séro-diagnostic positif à 1/100. Une première injection de 1 cent. cube de virus sensibilisé de Besredka est pratiquée le 6e jour, deux autres injections de 1 cent. cube sont faites le 9e et le 10e jour de la maladie; après une quatrième et dernière injection de 2 cent. cubes, a température s'abaisse à 37°6 le matin et à 38 degrés le soir, pour tomber à 36°4 le lendemain matin. A ce moment le pouls était à 76, tandis qu'il s'élevait à 103 la veille de la première injection, à 100 le jour de la 1re, à 88 après la 2e injection, à 80 à la suite des deux dernières injections.

La guérison de cette fièvre typhoïde fut obtenue le 14e jour, une semaine après la première injection. Cette observation prouve les bons effets de cette vaccinothérapie faite d'une manière précoce et à doses répétées.



Obs. XVII.



Obs. XVIII.

Obs. XVIII. — *Fièvre typhoïde traitée les 15e et 17e jours par une injection de 1 cent. cube de virus sensibilisé de Besredka. Retour de la température à la normale le surlendemain de la seconde injection. Guérison au 19e jour de la maladie.*

Cette jeune fille entre dans notre service de clinique médicale, salle Garnier, lit 5, à l'Hôtel-Dieu de Marseille, pour une fièvre typhoïde datant de 12 jours, bien caractérisée et avec séro-réaction positive au centième. La veille de la première injection, la température rectale est de 39 degrés le

matin et 39°5 le soir. Le soir de la première injection de 1 cent. cube de virus sensibilisé de Besredka pratiquée le 15e jour de la maladie, la température tombe à la normale, y reste dans la matinée du lendemain pour s'élever à 38°5 dans la soirée.

Une seconde injection de 1 cent. cube est faite le 17e jour de la maladie; le surlendemain, la température redevenait normale.

Cette observation montre les bons résultats donnés par cette vaccinothérapie pratiquée même tardivement.

Obs. XIX. — *Fièvre typhoïde grave non modifiée par une seule injection sous-cutanée de virus sensibilisé de Besredka. Guérison tardive.*

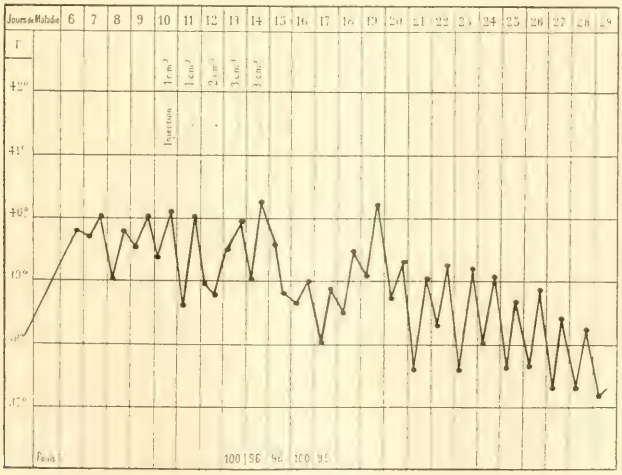
L... (Thomas), âgé de dix-huit ans, Espagnol, garçon de restaurant, se trouve à Marseille depuis quelques mois.

Il entre dans le service de clinique médicale de l'Hôtel-Dieu, salle Ducros, lit 29, pour une fièvre typhoïde grave caractérisée par de la prostration, de l'hébétude, de l'abattement, des épistaxis, des taches rosées, de la diarrhée avec gargouillement dans la fosse iliaque droite.

Une injection de 1 cent. cube de virus sensibilisé de Besredka est faite 7 jours après que le malade s'est alité. Elle n'a pas eu d'effet sur la courbe thermique qui est restée à 40 jusqu'au dixième jour, a oscillé entre 39 et 40 pendant les dix jours qui ont suivi. La durée de cette fièvre typhoïde a été longue (45 jours) et n'a pas été influencée par la trop faible quantité de virus sensibilisé injecté.

Obs. XX. — *Fièvre typhoïde grave traitée par 5 injections de virus sensibilisé de Besredka (c'est-à-dire par une dose totale de 10 cent. cubes), abaissement de la température pendant les 3 jours qui suivent la dernière injection de 3 cent. cubes, recrudescence le lendemain et chute progressive à partir du 20e jour de la maladie.*

T..., Espagnol, entre dans le service, à l'Hôtel-Dieu, salle Ducros, lit 17, le 26 avril 1913, pour une fièvre typhoïde grave, bien caractérisée. La séro-



Obs. XX.

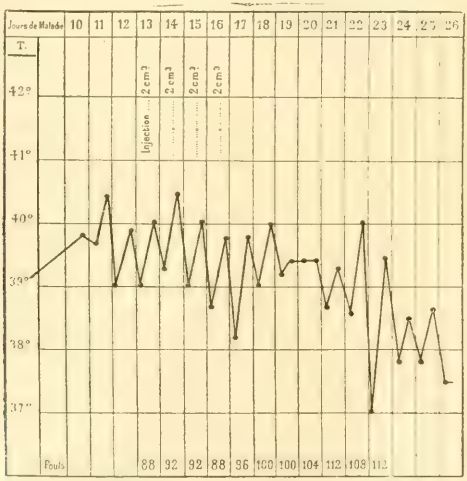
réaction est positive à 1/100, une injection de 1 cent. cube de virus sensibilisé de Besredka est faite les 10e et 11e jours de la maladie, la dose est de 2 cent. cubes le 12e jour, et de 2 cent. cubes les 13e et 14e jours.

Une première chute de température se produit après les 3 premières injections, la température est de 39 le matin et de 38°8 le soir.

Une seconde chute thermique est observée le lendemain de la dernière injection de virus sensibilisé au 15e jour de la maladie. Le soir, le thermomètre marque 38°8. Le 16e jour, la température est de 38°7 le matin, et 39 le soir. Le 17e jour, elle tombe à 38 le matin. Elle remonte progressivement pour atteindre 40°2 le 19e jour, puis elle baisse progressivement jusqu'à la guérison qui s'annonce le 29e jour, l'élévation du 31e jour étant passagère et due à un écart de régime, sans rechute.

Obs. XXI. — *Fièvre typhoïde traitée par deux injections de 1 cent. cube de virus sensibilisé de Besredka. Insuffisance des doses employées; hémorragies intestinales graves les 18e, 20e et 21e jours. Guérison.*

Mlle P..., âgée de seize ans, domestique, entre le 7 mai 1913, dans mon service de clinique médicale de l'Hôtel-Dieu, salle Garnier, lit 4, pour une fièvre typhoïde grave, dont le début remonte à 7 jours environ. Elle est caractérisée par les symptômes classiques habituels tels que lassitude, abattement, dépression énorme, langue saburrale, humide, rosée à la pointe et sur les bords, diarrhée jaunâtre, taches rosées lenticulaires, gargouillement et douleur à la pression dans la fosse iliaque droite, augmentation de volume de la rate qui est douloureuse à la pression et congestion pulmonaire. La séroréaction de Widal est positive à 1/100.



Obs. XXI.

Le 8 mai, l'état général est grave, la température rectale atteint 40 degrés à midi, 3 heures et 6 heures du soir. On fait une injection de 1 cent. cube de virus sensibilisé de Besredka le 9e jour de la maladie. La température est

de 38°9 à 9 heures du matin, de 39°3 à midi et 3 heures du soir. Le pouls qui ne battait qu'à 88 avant cette injection, monte à 102, quelques instants après.

Le 10e jour, la température rectale marque 39°1 à 9 heures du matin, 39°6 à midi, 40°5 à 3 heures du soir et 40 à 6 heures. On compte 94 pulsations à la minute.

Le 11e jour, on pratique une seconde injection sous-cutanée de virus sensibilisé de Besredka; le pouls reste à 88; la température monte à 39°5 le matin (avant l'injection), puis à 40 degrés à midi, 40°3 à 3 heures du soir et à 40°5 à 6 heures du soir.

Le 18e jour de la maladie, la température est de 39°7 le matin et à midi; elle tombe à 37°5 sous l'influence de deux hémorragies abondantes survenues à 3 heures du soir et à minuit.

Le 20e jour, l'hyperthermie est considérable (40°3 à 6 heures du matin, 40°4 à 9 heures, 40°6 à midi, 40°7 à 3 heures du soir, 40,5 à 6 heures); il survient une forte entérorrhagie.

Le 21e jour, deux nouvelles hémorragies très abondantes se reproduisent; la température s'abaisse à 37°2 à 6 heures du matin, 38 à 9 heures; elle remonte à 39°3 à midi et retombe à 37°1 à 6 heures du soir.

Le 22e jour, la température, qui est à 37°5 à 9 heures du matin, s'élève à 38°2 à midi, à 40°5 à 3 heures du soir, et à 40 à 6 heures.

Le 23e jour, elle atteint 40°2 à 3 heures et à 6 heures du soir, à partir du 24 mai, l'état général s'améliore progressivement et le 27 mai, la température revient à la normale, au 28e jour de la maladie. Une légère rechute très passagère au 35e jour. La guérison est complète, le 38e jour.

Obs. XXII. — *Fièvre typhoïde traitée, à partir du 16e jour, par le virus sensibilisé de Besredka, à la dose de 9 cent. cubes. Décès le 29e jour, par péritonite consécutive à une perforation intestinale.*

B... (Philippe), âgé de quinze ans, ne signale aucun antécédent héréditaire ou personnel. Il habite Marseille depuis deux ans.

Histoire de la maladie. — Elle a débuté, il y a quinze jours, par de la lassitude, du malaise, des épistaxis, de la céphalée, une fièvre de plus en plus élevée, de la diarrhée.

Il entre à l'Hôtel-Dieu, dans le service de clinique médicale, le 4 mars 1913, dans un état grave.

Examen clinique. — Somnolence, prostration, langue sèche, rôtie, trémulante, lèvres fuligineuses, angine de Duguet, abdomen météorisé, un peu de douleur dans la fosse iliaque droite, avec gargouillement, taches rosées lenticulaires, hypertrophie de la rate, anorexie, soif intense, diarrhée.

Appareil respiratoire. — Bronchite légère, un peu d'expectoration spumeuse, toux peu fréquente.

Urines rares, troubles, sans albumine.

Système nerveux : cauchemars, insomnie.

Pouls rapide; température élevée.

Injection de virus sensibilisé de Besredka à la dose de

1 cent. cube, le	5 mars 1913
2 cent. cubes, le	6 mars 1913
3 cent. cubes, le	7 mars 1913
3 cent. cubes, le	8 mars 1913

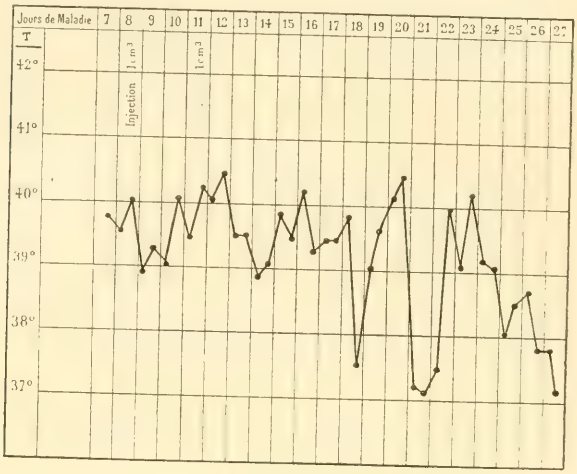
La température tombe de 40°4 à 39 degrés, le 9 mars.

12 *mars* 1913. Amélioration légère, délire, langue sèche. Le 15 et le 16 mars, la température matutinale tombe à 38° 2.

17 *mars* 1913. La température atteint 39° 9. Des signes de perforation intestinale se manifestent; le malade a des vomissements, des douleurs vives dans la fosse iliaque, de la défense musculaire à ce niveau. Le pouls est rapide.

19 *mars* 1913. Vomissements fécaloïdes, verdâtres; signe de péritonite aiguë: ventre rétracté, dur, matité au niveau de la fosse iliaque droite, facies tiré, pouls filant, incomptable.

Dyspnée. Selles diarrhéiques, verdâtres, très fétides.



Obs. XXII.

Décès par péritonite consécutive à une perforation intestinale, survenue au 30e jour d'une fièvre typhoïde.

Réflexions. — Il est à remarquer que la vaccinothérapie avec le virus sensibilisé a été employée trop tardivement chez ce petit malade seize jours après le début de la fièvre typhoïde).

9 cent. cubes de virus sensibilisé injectés en quatre jours ont bien fait baisser la température (19e et surtout le 22e jour de la maladie), mais n'ont pas empêché la production d'une perforation intestinale. Il est probable qu'il existait des ulcérations intestinales plus ou moins profondes à l'époque tardive où la vaccinothérapie a été commencée.

Obs. XXIII. — *Fièvre typhoïde grave, traitée par trois injections de 2 cent. cubes de virus sensibilisé de Besredka, faites à partir du 13e jour de la maladie. Hémorrhagies intestinales les 28e et 29e jours. Perforation intestinale. Mort par péritonite le 56e jour.*

A... (Gaston), employé, âgé de 21 ans, entré, le 10 février 1913, dans le service de clinique médicale de l'Hôtel-Dieu, salle Ducros, lit 2. Il habite Marseille depuis six mois. Le début de la fièvre typhoïde remonte au 28 janvier. A cette époque, il a eu des frissons, une céphalée intense, de la constipation, des sueurs nocturnes, des cauchemars. A son entrée à

l'Hôtel-Dieu, la perte d'appétit est complète, la soif intense, la langue humide, saburrale, les lèvres sont fuligineuses, l'abdomen est souple, météorisé, peu douloureux. Il existe des taches rosées lenticulaires, et on perçoit du gargouillement dans la fosse iliaque droite, malgré la constipation. La rate est perceptible à la palpation. Le malade a quelques épistaxis, le pouls est rapide, la température à 40 degrés. La séro-réaction est positive au centième pour l'Eberth; elle est négative pour les paratyphiques.

L'état général est grave, le malade a du délire et de la carphologie.

Une injection de 2 cent. cubes de virus sensibilisé de Besredka est faite les 13e, 14e, 15e jours de la maladie. Le lendemain de la dernière injection, la température vespérale, qui, la veille, était de 40°2, monte à 40°8. Deux jours plus tard, la température du matin est de 38°8 et celle du soir de 39° 6.

Le 28e jour, survient une hémorragie intestinale, de moyenne abondance; elle se renouvelle le lendemain.

L'état général s'aggrave.

Le 33e jour, la température du matin tombe à 37° 5, mais elle remonte progressivement (38 degrés à midi, 38°6 à 3 heures, 39 degrés à 6 heures du soir); elle augmente les trois jours suivants.

Le 37e jour, survient une légère détente, la température vespérale tombe à 38 degrés, puis elle remonte du 38e au 41e jour. A ce moment, l'état général devient mauvais; la température est à 40 degrés, la langue est sèche, la toux fréquente, l'expectoration abondante; la congestion pulmonaire est forte, la prostration considérable. Le 48e jour, après une détente durant six jours, une péritonite aiguë généralisée consécutive à une perforation intestinale se déclare brusquement. La température monte à 40°2. Les phénomènes péritonéaux sont graves, les vomissements fécaloïdes nombreux et abondants, la douleur abdominale est intense et s'accompagne de défense musculaire des parois et de météorisme. Le malade est en proie au délire, à de l'agitation.

Le 49e jour, la température tombe à 37 degrés, l'état général est mauvais, le malade est dans le collapsus; la péritonite fait des progrès et la mort arrive le 56e jour. L'autopsie ne fut pas autorisée.

Cet insuccès de la vaccinothérapie paraît tenir, en partie, à ce que les injections n'ont été pratiquées que treize jours après le début de cette fièvre typhoïde.

Obs. XXIV. — *Fièvre typhoïde grave avec forme ataxo-adynamique et congestion pulmonaire. Mort malgré trois injections de virus sensibilisé de Besredka.*

S. M... (Jean) entre, le 13 janvier 1913, pour une fièvre typhoïde grave, dans mon service, salle Ducros, lit 32.

Une injection de virus sensibilisé de Besredka est faite aux 10e 11e et 12e jour de la maladie.

Après une baisse momentanée de la température, qui tombe à 38°5; la courbe remonte progressivement, les phénomènes ataxo-adynamiques augmentent, la congestion pulmonaire s'accroît, la langue est trémulante. La mort survient le 7e jour, après la troisième injection, avec de graves phénomènes méningés et ataxo-adynamiques.

Remarques. — Ce malade n'avait reçu qu'une dose insuffisante de 4 cent. cubes. La séro-réaction était restée négative le 10e et le 14e jour, comme dans les formes primitivement graves; elle a été positive à 1/30, le 19e jour; le séro-diagostic a été négatif avec les paratyphiques.

Obs. XXV. — *Fièvre typhoïde grave et prolongée, momentanément améliorée par deux injections de virus sensibilisé de Besredka. Mort par septicémie et pyohémie provoquées par des suppurations multiples.*

D... (Jean) entre, le 10 mai 1913, salle Ducros, lit 28, à l'Hôtel-Dieu, avec tous les signes classiques d'une fièvre typhoïde, dont le diagnostic fut confirmé par une séro-réaction positive au centième.

Le malade raconte qu'il est alité depuis cinq jours. Le début de la maladie a été assez brusque et a consisté en quelques frissons, céphalée, courbature, constipation.

A l'examen clinique, on constate de la prostration, la langue est saburrale, les lèvres sont fuligineuses; puis, surviennent des épistaxis, de la diarrhée, des taches rosées lenticulaires; on note du gargouillement dans la fosse iliaque droite. La rate est perceptible à la palpation; le foie est normal.

Une première injection de virus sensibilisé de Besredka est faite le 7e jour. Le lendemain, la température tombe à 38°3 le matin, alors que la veille, avant l'injection, elle était à 39°1.

Une seconde injection d'un cent. cube est pratiquée le 9e jour; elle fait baisser à 38°2 la température vespérale, qui, la veille, atteignait 39°3.

Ces doses ne furent pas suffisantes, car la courbe thermique est restée irrégulière avec des surélévations à 40 degrés, les 11e, 16e, 20e et 23e jours.

De plus, ce malade a eu, à la suite d'injections défectueuses de spartéine, de sérum artificiel, d'huile camphrée, faites par le service de nuit, des abcès avec décollements et infiltrations profondes qui expliquent la persistance et l'irrégularité de la fièvre. Le malade succombe le 57e jour avec une courbe de septicémie et d'infection purulente.

En résumé, les résultats de la vaccinothérapie ont été favorables dans une première série de vingt et un cas comprenant les quinze observations qui ont servi de base à la note que nous avons communiquée à la Société de Biologie de Paris, le 8 mars 1913.

Les quatre cas suivants, qui ont été suivis de mort, n'atténuent pas la valeur de la vaccinothérapie pour les raisons suivantes :

Le jeune homme de quinze ans (*observation XXII*) qui mourut de péritonite par perforation intestinale, au 29e jour de sa fièvre typhoïde, ne reçut que trop tardivement, à partir du 16e jour, quatre injections de virus sensibilisé.

Chez le typhique de l'*observation XXIII*, deux injections de 2 cent. cubes de virus sensibilisé ne furent faites qu'à partir du 23e jour; des hémorragies intestinales se produisirent au 28e et au 29e jour; elles furent suivies d'une perforation intestinale qui entraîna une péritonite aiguë. La mort arriva le 56e jour.

Dans l'*observation XXIV*, la fièvre typhoïde grave, à forme

ataxo-adynamique, ne fut pas jugulée par trois injections de virus sensibilisé faites les 10e, 11e 12e jours; leur effet thérapeutique ne se traduisit que par une chute de température le lendemain de la dernière injection; puis la température remonta progressivement jusqu'à la mort, qui survint le 20e jour.

Enfin, dans l'*observation XXV*, la vaccinothérapie, pratiquée à temps, au 7e et au 9e jour, fut faite à dose insuffisante. La mort, qui survint au 57e jour, est attribuable à la septicémie et à la pyohémie provoquées par de vastes abcès consécutifs à des injections défectueuses de spartéine, d'huile camphrée, faites par le service de nuit. Ce décès ne peut être mis au passif de la vaccinothérapie.

En résumé, nous avons eu, sur ces 25 cas, 4 décès survenus chez des typhiques graves traités parfois trop tardivement ou à des doses insuffisantes par le virus sensibilisé de Besredka.

(*A suivre.*)

NOTE SUR LE « BACILLUS PERFRINGENS » VEILLON

par Mlle A. RAPHAEL

Nous nous sommes proposé d'étudier, avec quelques détails, les symptômes et lésions consécutifs à l'injection du *bacillus perfringens*, chez le cobaye et le lapin. Les trois cultures, principalement employées dans nos recherches, nous ont été obligeamment fournies par MM. Veillon et Loris-Melikoff. L'échantillon Veillon provenait du sang d'une malade atteinte de septicémie puerpérale, les deux échantillons Loris-Melikoff de selles humaines normales. Nous avons également isolé deux autres germes, chez le cobaye ; l'un offrait la même activité que les bacilles d'origine humaine, l'autre déterminait des réactions bien plus atténuées.

Nos microbes ont été conservés à la glacière, après culture en bouillon Martin simple; pour l'usage on ensemençait du bouillon Martin, glucosé à 0,2 p. 100 et on laissait vingt-quatre heures à 37 degrés. Comme tous ceux qui ont étudié le *b. perfringens*, nous avons constaté que son activité fléchit rapidement après la sortie de l'organisme. Il conviendra donc de perfectionner encore les procédés de conservation *in vitro*. Il conviendra, aussi, de s'efforcer d'obtenir une bonne « toxine soluble », car nul ne paraît y être arrivé et nous n'avons pas été beaucoup plus heureuse jusqu'ici.

Comme animaux d'expérience, nous avons fait usage de cobayes (mâles), de 500-600 grammes et de lapins de 2.000-2.500 grammes. Les recherches que nous allons résumer concernent des *cultures à leur maximum d'activité*.

Expériences sur les cobayes.

Injections intraveineuses.

2 cent. cubes tuent en 5-8 heures, 1 cent. cube en 8-12 heures, 1/2 cent. cube en 1/2 jour-plusieurs jours; 10^{-1}

demeure inoffensif. Nous décrirons *trois types anatomo-cliniques*.

Mort en 5-8 heures. — *Cliniquement* : après quelques heures, hébétude, poil piqué ; ventre gros, tendu, sensible ; *hématurie*. Puis, coma, décubitus latéral, respiration saccadée, convulsions de temps en temps. Enfin, gêne croissante de la respiration et arrêt à un moment donné. — *A l'autopsie* : congestion violente des viscères abdominaux, rate grosse et noire, reins foncés, sang dans la vessie ; poumons pâles ; sang incoagulable.

Mort en 12 heures. — Coma à développement progressif. *Post mortem*, mêmes lésions que tout à l'heure (sang coagulable, cependant) ; de plus : épanchement rosé intra-abdominal et nécroses hépatiques. Cultures positives, avec le sang et l'exsudat abdominal.

Mort en quelques jours. — Emaciation, cachexie : l'animal « s'éteint ». Atrophie des viscères ; nécroses hépatiques ; reins décolorés ; cultures positives ou non avec le sang, selon la durée de la survie. (Parfois pleurésie bilatérale à *perfringens* : fausses membranes jaune sale, épaisses ; liquide rougeâtre).

Injections sous-cutanées.

1-2 cent. cubes tuent en 1-plusieurs jours. Lorsque la mort survient assez rapidement, on ne retrouve d'ordinaire que le *perfringens* dans le sang ; quand les animaux « traînent », on voit apparaître avec lui, ou même sans lui, le pneumocoque et la *pasteurella* (« microbes de sortie » habituels des rongeurs de laboratoire) — 10^{-1} cent. cube ne tue pas toujours — 10^{-2} cent. cube détermine un simple œdème transitoire.

Nous décrirons, successivement, les *cas curables* et les *cas mortels*.

Cas curables. — *Dans la journée.* Localement, œdème à marche rapide, mou, crépitant, atteignant souvent le volume d'un œuf de pigeon. Téguments violets ou vert pâle, sur l'étendue d'une pièce de 2 francs (ou davantage). Puis, *décollement de la peau* (précédant le début de *l'eschare*, quand on a injecté 10^{-1} cent. cube), sur l'étendue d'une pièce de 5 francs (ou davantage) ; les téguments offrent alors une teinte variable : bleue, violette, brune, ordinairement « vert de vessie ». — *Le*

lendemain. Poche, plus ou moins tendue, pouvant atteindre les dimensions de 12 cent. sur 6 et entourée d'un œdème circulaire. A la ponction : liquide rouge sale, vert par réflexion, trouble, représentant une culture pure de *perfringens*. La peau qui recouvre la poche présente un ton vert-de-gris, souvent cerclé de brun. — *Le surlendemain*, poche flasque. — *Puis*, la poche s'affaisse de plus en plus et disparaît. L'eschare offre d'abord l'aspect du parchemin mouillé et, ensuite, se dessèche en brunissant. L'empâtement diminue et durcit, formant disque autour de la partie nécrosée. Celle-ci tombe à la fin, démasquant un ulcus bourbillonneux qui se cicatrise lentement.

Cas mortels. — Phénomènes généraux analogues à ceux que détermine l'injection intraveineuse, pour une survie égale. — *A l'autopsie* : exsudat local saumon sale, consistant, rempli de *perfringens* ; quelquefois, décollement de toute la peau du tronc (partie antérieure), avec aspect cuit des tissus ; congestion des viscères abdominaux dans les cas rapides, nécroses hépatiques et pâleur des reins dans les cas lents.

[*Infections associées ou secondaires.* — Les germes qui les occasionnent peuvent coexister localement avec le *perfringens*; ils envahissent le sang tantôt avec lui, tantôt seuls et déterminent, dans ce dernier cas, une septicémie pure ou aggravée de péritonite.]

Injections intrapleurales.

1 cent. cube tue en 8-12 heures. Mêmes symptômes qu'après l'injection intraveineuse. — *A l'autopsie* : œdème hémorragique de la paroi thoracique ; épanchement bilatéral, plus ou moins sanguinolent ; fausses membranes ; congestion pulmonaire ; quelquefois, épanchement rosé dans le péricarde ; pour le reste, comme après l'injection intraveineuse.

Expériences sur les lapins.

Injections intraveineuses.

3 cent. cubes tuent en 1/2 heure-2 heures, par arrêt respiratoire, précédé d'*hématurie*. A l'autopsie : congestion violente

des viscères abdominaux (parfois hémopéritoine); sang dans la vessie; poumons pâles; sang incoagulable (caillots ou non dans le cœur). — 2 cent. cubes ne déterminent que des phénomènes passagers (hébétude, miction sanglante, défécation). — 1 cent. cube demeure inoffensif.

Injections sous-cutanées.

1-2 cent. cubes tuent rarement, avec ou sans « sortie » de germes étrangers (mort en quelques jours).

Cas curables. — Grandes *différences individuelles* dans la réaction locale. On peut distinguer 3 types principaux : (1) Œdème transitoire, avec érythème fugace des téguments. — (2) Œdème durable; tache cutanée généralement verte et bien développée après vingt-quatre heures. Cette tache représente le début d'une eschare, qui s'élimine ultérieurement; ulcus à cicatrisation assez rapide. — (3) Réaction plus violente : œdème étendu, eschare offrant, le lendemain de l'injection, l'aspect du parchemin mouillé; ulcus à cicatrisation lente; en somme, lésions analogues à celles que l'on rencontre chez le cobaye, mais *absence* constante de *décollement*.

Cas mortels. — Emaciation; troubles respiratoires ultimes; quelquefois, parésie des membres postérieurs. — *A l'autopsie* : exsudat jaune local, rempli de *perfringens*; reins pâles, quelquefois nécroses hépatiques; cultures du sang généralement positives.

[*Infections associées ou secondaires.* — Mêmes réflexions que pour les cobayes; toutefois, nous n'avons jamais observé de péritonite.]

Conclusions.

Nous croyons pouvoir interpréter, comme il suit, le résultat de nos expériences.

Cobayes.

Injections intraveineuses. — Les germes inoculés sont détruits, naturellement, d'autant moins vite qu'on en introduit davantage. Avec les *fortes doses*, il y a sécrétion rapide

d'une toxine analogue aux venins des vipéridés types et suffisamment abondante pour engendrer la dépression artérielle (et son aboutissant, l'arrêt respiratoire), l'incoagulabilité du sang et l'hématurie. Avec les *doses moindres*, l'évolution, plus lente, se double d'une tendance à la localisation, non seulement de la toxine (nécroses hépatiques, lésions rénales), mais aussi des germes introduits (épanchement abdominal). Avec les *doses faibles*, enfin, les microbes non détruits peuvent se développer uniquement en un point (pleurésie métastatique.

Injections sous-cutanées. — Comme les venins de vipéridés, la toxine provoque l'eschare humide type; quant au décollement *caractéristique*, il faut le rapporter à la sécrétion d'enzymes saccharolytiques, identiques à ceux qui, *in vitro*, disloquent violemment la gélose sucrée (d'où une double justification du nom de *perfringens*, créé par Veillon). Nous avons vu que, pour une dose convenable de germes, le décollement précédait l'eschare; le microbe fabrique donc plus facilement, sous la peau du cobaye comme *in vitro*, les enzymes en question qu'il n'y sécrète le poison spécifique.

[Les *injections intrapleurales* ne prêtent à aucune remarque intéressante.]

Lapins.

Injections intraveineuses. — Les germes sont détruits plus rapidement que chez les cobayes, mais la sensibilité à la toxine demeure identique (sinon plus grande).

Injections sous-cutanées. — Destruction plus rapide que chez les cobayes, ici encore, avec des différences individuelles très marquées. Absence de sécrétion des enzymes saccharolytiques ou neutralisation de ces enzymes ou insuffisance quantitative des substances sur lesquelles ils agissent (questions à élucider).

Le Gérant : G. Masson.

Paris — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

28e ANNÉE JUIN 1914 N° 6

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

DE LA RÉACTION DE FIXATION CHEZ LES TUBERCULEUX

par A. BESREDKA et J. MANOUKHINE
(Laboratoire de M. Metchnikoff.)

I

A cinquante cobayes de 350 à 500 grammes, il est injecté 1/100 de milligramme de bacilles tuberculeux sous la peau. Neuf jours après, on en sacrifie deux, ainsi que deux cobayes témoins. Un des deux inoculés a la rate légèrement augmentée de volume et de petits ganglions dans l'aine; l'autre n'a rien. On récolte le sérum de ces quatre cobayes pour y rechercher des anticorps au moyen de la réaction de Bordet-Gengou.

Comme antigène, on emploie la tuberculine préparée par un de nous et obtenue avec des cultures en bouillon à l'œuf, décrit ailleurs (1).

Ce premier examen a donné une réaction nettement positive: donc, neuf jours après l'injection d'une dose minime de virus, alors qu'à l'examen macroscopique, les lésions sont à peine marquées ou nulles, il y a des anticorps dans le sérum.

Combien de temps ces anticorps persistent-ils dans le sérum?

Nous avons sacrifié les autres cobayes de la série après 12, 15, 20, 29, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 105, 110 et

(1) Voir ces *Annales*, 1913, p. 1009.

113 jours. La marche de la tuberculose est, on le sait, sujette à des variations, même chez les cobayes inoculés dans les mêmes conditions. Ces différences individuelles n'empêchent pas tout de même, surtout quand on expérimente sur un grand nombre d'animaux, de se faire une idée d'ensemble du phénomène.

Or, en examinant les cobayes tuberculeux à des intervalles indiqués, nous avons vu que ce pouvoir de fixer l'alexine, en présence de la tuberculine, devenait de plus en plus marqué. A certains moments (entre le 50e et le 80e jour), il baissait pour redevenir ensuite de nouveau très prononcé pendant une certaine période (à partir du 90e jour); il retombait à zéro quelque temps avant la mort de l'animal.

A quel moment apparaissent les anticorps et quels sont leurs caractères au début de l'infection?

Pour nous en rendre compte, nous avons inoculé 46 autres cobayes dans des conditions à peu près analogues à celles de la première série.

Chaque jour, dès le lendemain de l'inoculation, on sacrifiait un ou deux cobayes, pendant 29 jours de suite; on examinait le sérum au point de vue de la fixation de l'alexine tout en notant l'état des organes.

Le premier jour, la réaction a été négative. Les deux jours suivants, il y a eu un commencement de fixation. Le 4e jour, la fixation a été nette. A partir de ce jour, la réaction est restée positive tout en présentant des oscillations jusqu'au 16e jour. Entre le 17e et le 29e jour, la fixation n'a été que partielle. Elle a été trouvée fortement prononcée entre le 64e et le 70e jour.

Chez les cobayes de cette série, pendant les dix premiers jours qui ont suivi l'inoculation, on ne pouvait constater aucune lésion macroscopique; la rate, qui est généralement la première touchée, a conservé son aspect et ses dimensions normales.

L'antigène à l'œuf a donc permis de déceler la présence d'anticorps dès le 4e jour de l'infection, alors qu'il n'y a pas encore eu de lésions visibles à l'œil nu.

Comment les anticorps se modifient-ils sous l'influence de la tuberculine?

A deux cobayes ayant reçu 9 jours auparavant des bacilles tuberculeux (1/100 milligramme) sous la peau, on injecte dans le péritoine 0,25 cent. cubes de tuberculine brute, dans 2,5 cent. cubes d'eau physiologique. Le lendemain, on saigne les deux cobayes, ainsi que deux autres tuberculeux de la même série, mais non injectés avec la tuberculine.

Chez les deux derniers, le sérum donne une réaction de fixation très nette; chez les deux cobayes ayant reçu la tuberculine, la fixation est, par contre, nulle. Dans ce dernier cas, non seulement l'hémolyse n'est pas empêchée, elle semble même favorisée : elle apparaît quelquefois plus tôt que dans les tubes contenant du sérum de cobaye normal. On ne pourrait se l'expliquer autrement qu'en admettant que ce dernier renferme un anticorps normal; que cet anticorps s'accroît sous l'influence du virus inoculé, et que l'injection de la tuberculine amène une neutralisation totale de l'anticorps, aussi bien de celui qui s'est formé après l'inoculation que de celui qui était préformé chez le cobaye normal.

Ajoutons que, dans les conditions d'expérience indiquées, l'anticorps n'a réapparu dans le sérum que 6 ou 7 jours après l'injection de la tuberculine.

En résumé :

1° Au moyen de la tuberculine à l'œuf, on peut révéler dans le sérum des cobayes tuberculeux un anticorps fixant l'alexine dès le 4e jour de l'infection.

2° Cet anticorps persiste dans le sérum des cobayes tuberculeux pendant la grande partie de la maladie et n'en disparaît qu'avant la mort.

3° Cet anticorps disparaît du sérum pendant plusieurs jours, sous l'influence de la tuberculine.

Faisons remarquer, pour éviter toute erreur d'interprétation, que bien souvent les sérums des cobayes, chez lesquels le

processus est déjà avancé, fixent d'eux-mêmes une grande quantité d'alexine, en l'absence de l'antigène (1). N'ayant jamais observé rien de pareil avec les sérums de cobayes normaux, nous estimons que cette fixation est l'apanage des cobayes tuberculeux.

Peut-être le sang des cobayes tuberculeux charrie-t-il à la fois l'antigène et l'anticorps et ceux-ci en se rencontrant dans le sérum, se combinent-ils entre eux et donnent-ils lieu à une fixation spécifique de l'alexine.

Toujours est-il que lorsqu'on injecte à un cobaye tuberculeux, dont le sérum est par lui-même empêchant, une dose non mortelle de tuberculine, son sérum perd, au bout de 6-8 heures, sensiblement de son pouvoir antihémolytique.

II

L'apparition précoce de la réaction de fixation chez le cobaye tuberculeux nous a incités à faire des recherches de même ordre chez l'homme.

Nous nous sommes adressés tout d'abord à des personnes non hospitalisées. Grâce à l'aide bienveillante de MM. Levaditi et Latapie, nous avons pu examiner 750 personnes parmi celles qui se présentent à l'Institut Pasteur pour la réaction de Wassermann.

L'examen du sérum de ces 750 personnes nous a donné, avec l'antigène tuberculeux, les résultats suivants :

69	réactions	positives (9,2 p. 100) ;
16	—	partielles (2,1 p. 100) ;
665	—	négatives (88,7 p. 100).

Sur les 69 *individus* ayant donné une réaction positive, nous en avons examiné 53 au point de vue clinique, les autres n'ayant pas répondu à la convocation. Chez ces 53 individus, l'examen clinique a fourni les résultats suivants :

(1) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXXVI, p. 638.

37, tuberculose pulmonaire au premier degré;
4, tuberculose pulmonaire au deuxième degré;
1, respiration saccadée au sommet droit, sans autres symptômes;
1, matité au sommet gauche; à l'examen radioscopique, ganglions bronchiques;
4, expiration prolongée à gauche, sans autres symptômes;
1, lésion cutanée de nature non déterminée;
1, le sérum empêche l'hémolyse à lui seul, en l'absence d'antigène;
4, aucun signe objectif (deux d'entre eux cohabitent avec des personnes tuberculeuses; un a une bronchite chronique; un autre, une bronchite aiguë empêchant de juger de l'état des sommets).

Total : 53.

Notons, en passant, qu'avec l'antigène syphilitique, les sérums de ces 69 individus ont donné la réaction positive dans 51 cas, la réaction partielle dans 1 cas et la réaction négative dans 17 cas. Faisons remarquer que les sérums qui fixent fortement l'antigène syphilitique ont toujours une tendance à se comporter de même vis-à-vis de l'antigène tuberculeux.

Sur les 16 individus ayant donné une réaction partielle, chez 14 examinés cliniquement on a pu déceler, au moyen de la percussion et de l'auscultation, des lésions peu étendues aux sommets; il s'agissait dans la plupart des cas de processus plus ou moins anciens, en voie de cicatrisation. La réaction de fixation partielle semble donc correspondre à des lésions cicatricielles.

Avec l'antigène syphilitique, ces 16 sérums ont donné la réaction positive dans 8 cas, la réaction partielle dans 4 cas et la réaction négative dans 4 cas.

Sur les 665 individus ayant donné une réaction négative, nous n'avons examiné, au point de vue clinique, que 145, en choisissant de préférence des sujets qui ne nous paraissaient

pas jouir d'une santé parfaite. L'examen de ces 145 individus nous a fourni les résultats suivants :

107, ne présentent rien d'anormal;
15, présentent des signes faisant suspecter une ancienne lésion tuberculeuse;
3, bronchite aiguë;
17, bronchite chronique;
1, diabète;
1, ictère;
1, paludisme.

Les sérums de ces 665 individus, examinés au point de vue de la réaction de Wassermann, se sont montrés positifs dans 253 cas (38 p. 100), partiels dans 50 cas (7,5 p. 100), négatifs dans 362 cas (54,5 p. 100).

Nous nous sommes ensuite adressés à des personnes dont nous connaissions d'avance l'histoire clinique : c'étaient tantôt des personnes de notre entourage, tantôt des malades hospitalisés (1). Ces personnes appartiennent à plusieurs catégories; elles sont au nombre de 150, et cliniquement peuvent être réparties de la façon suivante :

Non-tuberculeux :

16, état général excellent;
11, anciens tuberculeux guéris;
16, maladies diverses (artériosclérose et lésions organiques du cœur, néphrites aiguë et chronique, pneumonie grippale, pleurésie, chlorose, anémie pernicieuse, cirrhose du foie, paludisme, échinococcie, bronchite, diabète, salpingite).

Tuberculeux :

2, tuberculose du larynx;
4, tuberculose rénale;
1, tuberculose de la glande mammaire;
16, tuberculose pulmonaire au premier degré;
31, tuberculose pulmonaire au deuxième degré;
53, tuberculose pulmonaire au troisième degré.

(1) Nous remercions les Drs Rist, Robin et Vaquez, chefs de service à Laënnec, Beaujon et Saint-Antoine, ainsi que les Drs Doyen, N. Fiessinger et Jamanouchi, de leur précieux concours.

Chez tous les non-tuberculeux, la réaction de fixation a été négative. Par contre, dans toutes les formes de tuberculose, laryngée, rénale, mammaire et pulmonaire, il y a eu, à quelques exceptions près, une fixation plus ou moins marquée de l'alexine, en présence de l'antigène tuberculeux. Nous disons plus ou moins marquée, car :

Sur 31 tuberculeux du deuxième degré, 3 ont donné une fixation partielle;

Sur 53 tuberculeux du troisième degré, 9 ont donné une fixation partielle et 11 n'ont pas donné de fixation du tout.

Ajoutons que ces 11 malades qui ont donné une réaction négative sont morts dans les 15-30 jours qui ont suivi l'examen du sang (1).

En résumé :

1° Dans la première période de la tuberculose, la réaction de fixation est toujours positive;

2° Dans la seconde période, la réaction est positive dans la grande majorité des cas;

3° Dans la troisième période, la réaction est souvent partielle ou négative; dans ce dernier cas elle est généralement présage d'une issue fatale à brève échéance.

La conclusion générale qui se dégage de l'ensemble des faits exposés dans cet article est que le cobaye et l'homme réagissent à peu près de la même façon à l'infection tuberculeuse; cette réaction, qui se traduit par l'apparition dans le sérum d'un anticorps spécifique, peut être utilisée pour le diagnostic et, jusqu'à un certain degré, pour le pronostic de la tuberculose.

(1) Signalons dès maintenant que les sérums des personnes atteintes de pleurésie avec épanchement, de méningite tuberculeuse et de granulie donnent une réaction de fixation négative.

LA GÉLOSE A L'ŒUF

par A. BESREDKA et F. JUPILLE

(Laboratoire de M. Metchnikoff.)

Les milieux de culture usuels sont ou solides, ou liquides. Les premiers, en offrant aux microbes une large surface, leur permettent de se développer sans qu'ils soient gênés par les produits d'échange : les seconds présentent surtout l'avantage d'être riches en matières nutritives.

Mais les uns et les autres donnent un rendement bien inférieur à celui que l'on peut obtenir en les combinant.

En effet, lorsqu'on constitue un milieu mixte, une sorte de milieu solide-liquide, les cultures sont notablement plus riches que celles fournies par chacun des milieux employés séparément.

Le principe de milieu solide-liquide a été mis en œuvre la première fois pour le streptocoque il y a une dizaine d'années (1). Ayant besoin, pour la préparation du sérum antistreptococcique, de grandes quantités de corps de microbes, nous avons eu l'idée de nous servir d'un milieu mixte que nous avons appelé *gélose-sérum* et qui n'est rien autre que de la gélose arrosée de sérum.

La gélose seule est, comme on le sait, un milieu médiocre pour les streptocoques. Au bout de vingt-quatre heures, on voit des colonies granuleuses, ponctiformes, se détachant difficilement du milieu et donnant une récolte très pauvre. Mais il suffit d'arroser, une heure avant l'ensemencement, la boîte de Roux avec 1-2 cent. cubes de sérum chauffé de cheval, de façon à laisser la gélose s'imprégner de substances nutritives de sérum, pour obtenir, vingt-quatre heures après, une culture de streptocoques des plus abondantes ; elle est d'une richesse

(1) A. Besredka, ces *Annales*, 1904, t. XVIII, p. 365.

telle que, malgré nos dix années de pratique, nous sommes chaque fois à nous demander si nous ne sommes pas victimes d'une contamination, tellement est luxuriante la récolte des streptocoques sur gélose-sérum.

Dernièrement nous avons décrit un milieu liquide, le bouillon à l'œuf (1). Les microbes les plus exigeants, tels que le gonocoque, le microbe de la coqueluche, le pneumocoque, le bacille tuberculeux et beaucoup d'autres s'y développent rapidement et abondamment. On pouvait se demander si, en constituant un milieu solide-liquide avec du bouillon à l'œuf, on n'arriverait pas à faire pousser sur gélose des microbes qui s'y montrent, en général, réfractaires.

Nos essais ont porté sur le gonocoque, le microbe de la coqueluche de Bordet et Gengou, le microbe de Pfeiffer, le pneumocoque, le méningocoque, le streptocoque et les bacilles tuberculeux, humain et bovin.

Les boîtes de Roux contenant de la gélose ordinaire, peptonée ou apeptonée (2), sont arrosées avec 4 cent. cubes de bouillon à l'œuf. Elles sont laissées à l'étuve au moins pendant une nuit avant l'ensemencement, afin de rendre plus complète l'imprégnation de la gélose par le bouillon.

Il est inutile d'entrer dans la description détaillée de chacun des microbes cultivés sur gélose à l'œuf. Faisons remarquer que tous ont donné, surtout après avoir passé trois ou quatre fois par le bouillon à l'œuf, des cultures d'une abondance inconnue jusqu'à présent, même dans leurs milieux de prédilection.

Le coccobacille de Bordet et Gengou, contrairement aux autres qui se développent déjà en 24 heures, exige 48 heures d'étuve, après quoi toute la surface du milieu se recouvre d'une couche de microbes très épaisse, de consistance de crachats mucopurulents.

Le bacille tuberculeux commence à se développer après

(1) Ces *Annales*, 1913, p. 1009.

(2) Pour préparer de la gélose apeptonée, nous faisons une macération de 750 grammes de viande dans 1.200 cent. cubes d'eau. Cette macération, chauffée d'abord à petit feu, puis portée à l'ébullition pendant une demi-heure environ, est réduite par évaporation à un litre. Après filtration, on ajoute 2 p. 100 de gélose que l'on fait fondre à petit feu. On alcalinise franchement; on fait de nouveau bouillir la gélose pendant vingt-cinq minutes, après quoi on la répartit en tubes que l'on stérilise à 115 degrés.

48 heures, surtout lorsqu'il est habitué au bouillon à l'œuf. Après 8 jours d'étuve, toute la surface est tapissée d'un semis innombrable de granulations ou de petites écailles de forme irrégulière.

On peut employer aussi avantageusement de grands tubes de gélose (22 × 22), arrosés de 2 cent. cubes de bouillon à l'œuf.

En résumé : la gélose à l'œuf est un milieu de choix, au point de vue de l'abondance et de la rapidité du développement, pour un grand nombre de microbes difficiles à cultiver ou à conserver, tels que le gonocoque, le microbe de la coqueluche, le pneumocoque, le bacille tuberculeux, etc.

RECHERCHES SUR LE PLEXUS CARDIAQUE ET SUR L'INNERVATION DE L'AORTE

par Y. MANOUÉLIAN
de l'Institut Pasteur de Paris.

(Avec les planches XIX et XX.)

A la suite de nos recherches sur la pathogénie des altérations artérioscléreuses, nous avons entrepris l'étude histologique du système nerveux à l'état normal et pathologique. Dans ce travail nous relatons nos résultats sur l'innervation de la portion ascendante et de la crosse de l'aorte du chien normal.

Pour cette étude, nous nous sommes servi de la méthode d'imprégnation au nitrate d'argent, précédée de la fixation des pièces par l'alcool ammoniacal.

Ce qui nous a frappé d'abord, c'est l'*existence de nombreux centres nerveux dans le plexus cardiaque postérieur*. Comme on le sait, ce plexus, situé derrière l'aorte et en avant de la trachée, est composé de filets nerveux richement anastomosés. Or nous y avons observé des ganglions nerveux contenant des cellules à type sympathique, ganglions dont la plupart sont microscopiques ; on en trouve pourtant qui sont visibles à l'œil nu sur des coupes imprégnées, mais ils sont toujours fort petits (planche XIX, fig. 1, 2, 3).

Leur nombre est plus ou moins considérable suivant les régions ; sur une seule coupe nous en avons compté jusqu'à sept et parfois même davantage.

De plus, il n'est pas rare de rencontrer dans le tissu interstitiel du plexus des cellules nerveuses solitaires. On peut en rencontrer aussi dans les troncs nerveux où, maintes fois, on constate l'existence des ganglions nerveux minuscules.

On sait que le plexus cardiaque postérieur est formé de la plupart des nerfs cardiaques sympathiques ainsi que de la plupart des nerfs cardiaques du pneumogastrique. Etant donnée la part prépondérante que prend ce plexus (appelé à juste titre

grand plexus cardiaque de Haller) à la constitution du plexus cardiaque et consécutivement à l'innervation du cœur et des gros vaisseaux, l'existence de nombreux centres nerveux dans son intérieur nous paraît un fait très important.

Ce qu'il y a de remarquable encore, c'est la présence de cellules nerveuses dans l'aorte en pleine mésartère (planche XIX, fig. 4).

Il s'agit de cellules solitaires, à type sympathique, siégeant dans le tissu conjonctif de la mésartère. Dans nos imprégnations elles sont en nombre restreint.

Terminaisons nerveuses au niveau des fibres élastiques et des cellules musculaires lisses de l'aorte.

De calibre variable et plus ou moins onduleuses, les fibres nerveuses quittent le tissu conjonctif de la mésartère et se dirigent vers les fibres élastiques et les cellules musculaires lisses ; après un certain parcours, elles se terminent à leur niveau soit par un renflement qui peut affecter la forme d'un bouton arrondi, soit par une extrémité plus ou moins effilée (planche XIX et XX, fig. 6 et 7).

Au niveau des cellules musculaires lisses, il existe des arborisations analogues aux plaques motrices des muscles striés (planche XIX, fig. 5).

Terminaisons nerveuses dans le tissu conjonctif de la mésartère.

Ce tissu est richement innervé; à part les fibres nerveuses destinées aux fibres élastiques et aux cellules musculaires lisses, il en existe en grand nombre qui s'y terminent. Nous avons découvert des modes de terminaison nerveuse dont voici les plus intéressants : de fines fibres se ramifiant dans une certaine étendue (planche XX, fig. 8). Des grosses fibres nerveuses se terminant par un renflement considérable en forme de hache ou de massue. Souvent disposées sans ordre, quelquefois ces massues se groupent ensemble en nombre variable. Sur de bonnes imprégnations, on voit nettement les fibrilles de la fibre nerveuse s'étaler en un réticulum très fin à leur niveau (planche XX, fig. 9).

D'autres fibres nerveuses se terminent par un renflement moins considérable que les précédentes sous la forme de gros boutons. Il y en a aussi qui, au niveau de leur renflement terminal, présentent de petites excroissances.

Enfin, il existe un autre mode de terminaison nerveuse ; les fibres nerveuses se résolvent en fines fibrilles, formant une élégante pelote (planche XX, fig. 10).

Comme toutes ces fibres nerveuses ne sont pas en rapport avec les éléments moteurs (les cellules musculaires lisses), mais qu'elles se terminent dans le tissu conjonctif, force nous est donc d'admettre qu'elles sont de nature sensitive.

On n'avait jamais signalé l'existence de terminaisons sensitives dans la mésartère. Nos recherches montrent qu'il en existe de nombreuses, polymorphes.

Le rôle des terminaisons sensitives doit être très important dans le mécanisme de la dilatation et de la constriction des artères. Ce sont les fibres sensitives vasculaires qui apportent l'excitation à leurs cellules, lesquelles, par leur prolongement central, la réfléchissent directement ou indirectement sur les neurones sympathiques vaso-moteurs, neurones dont le prolongement périphérique transporte l'excitation à la cellule musculaire de l'artère. Il s'agit, en somme, d'un réflexe dont le point de départ est l'arborisation sensitive, et le point terminal la terminaison nerveuse motrice au niveau de la cellule musculaire lisse.

EXPLICATION DES PLANCHES XIX ET XX

Figures 1, 2, 3. — Ganglions nerveux du plexus cardiaque postérieur. Grossissement : 70, 80, 200 diamètres.

Fig. 4. — Cellule nerveuse siégeant en pleine mésartère. Grossissement : 1.000 diamètres.

Fig. 5. — Terminaison nerveuse au niveau d'une cellule musculaire lisse ; cette terminaison rappelle par sa forme la plaque motrice des fibres musculaires striées. Grossissement : 1.000 diamètres.

Fig. 6 et 7. — Fibres nerveuses se terminant par un renflement au niveau d'une cellule musculaire lisse. Dans la figure 6, le bouton terminal se trouve à cheval sur une fibre élastique et une cellule musculaire lisse. Grossissement : 800 diamètres.

Fig. 8. — Fibrilles nerveuses terminales dans le tissu conjonctif. Grossissement : 800 diamètres.

Fig. 9. — Terminaisons en massue. Grossissement : 1.000 diamètres.

Fig. 10. — Fibres nerveuses du tissu conjonctif. Remarquer une belle pelote terminale formée par quelques fibres nerveuses afférentes. Grossissement : 800 diamètres.

A PROPOS DES THÉORIES NOUVELLES SUR LA PATHOGÉNIE DE L'ANGINE DE POITRINE

par Y. MANOUÉLIAN

Les recherches que nous venons d'exposer dans le travail précédent permettent de nous rendre compte de la pathogénie des crises de l'angine de poitrine. Nous savons désormais que la théorie coronarienne de ce syndrome s'est écroulée devant l'observation rigoureuse des faits d'ordre anatomo-clinique et physiologique. Il est démontré, en effet, que, chez des sujets ayant présenté des accès d'angine de poitrine, on n'a trouvé aucune lésion des coronaires à l'autopsie. D'autre part, l'on a constaté la sténose ou l'oblitération des artères cardiaques chez des individus qui n'avaient jamais eu d'angine de poitrine pendant leur vie. La physiologie a montré de son côté qu'après la ligature d'une branche des coronaires, les contractions cardiaques cessent dans la portion irriguée par cette branche, et que, lorsqu'on on lie les deux coronaires à la fois, le cœur cesse de battre.

Il a donc fallu chercher d'autres facteurs pour la pathogénie de ce syndrome. Nothnagel, étudiant la relation entre le spasme vasculaire périphérique accompagné d'hypertension et l'angine de poitrine, a distingué un type d'angine vaso-motrice. Pal, Rist et Krantz, Vaquez ont établi que la pression sanguine même, si elle est normale ou basse, s'élève considérablement au moment où les accès éclatent. Or nous savons que l'élévation de la tension artérielle a pour effet l'hypertrophie du ventricule gauche et la dilatation de l'origine de l'aorte; mais, même avant d'en arriver à des lésions définitives, affirme Vaquez, on peut dans des accès aigus d'hypertension en reconnaître l'équivalent. L'accentuation si caractéristique du deuxième bruit aortique au cours des crises éclamptiques en est la preuve. Cette accentuation s'accompagne d'une distension transitoire de l'aorte à son origine qui disparaît lorsque la tension artérielle est revenue à la normale. Les expériences de Hurthle

démontrent la réalité de cette distension. En effet, chez l'animal, une augmentation de la pression artérielle équivalant à 10 millimètres correspondait à une augmentation de la capacité aortique d'environ 2 centimètres cubes.

Ce n'est donc pas seulement le cœur mais aussi l'origine de l'aorte qui supporte les effets de la tension artérielle exagérée et en réalité toute la région initiale du système artériel, toute la zone aortico-ventriculaire.

Chez des malades en état de mal angineux, M. Vaquez a constaté l'évolution parallèle de l'hypertension, de la distension cardio-aortique et de l'aire douloureuse. Dès la fin de la crise, la matité cardio-aortique reprenait ses dimensions initiales en même temps que la pression revenait à l'état normal.

Ces recherches ont conduit M. Vaquez à cette conviction que la distension aortique brusque, que provoque chez un sujet, dont l'aorte est déjà malade, une élévation accidentelle de pression, est la raison de l'apparition de l'accès douloureux.

L'existence de si nombreuses terminaisons sensitives, des cellules nerveuses dans la mésartère de l'aorte, ainsi que celle d'un nombre si considérable de centres nerveux juxta-aortiques échelonnés dans le plexus cardiaque postérieur, viennent appuyer vigoureusement cette théorie, et d'autant plus que, dans l'angine de poitrine, l'aortite et la péri-aortite sont presque constantes.

A côté de ces notions désormais acquises, nous estimons qu'on doit envisager aussi, à l'origine du syndrome angineux, l'éventualité d'une inflammation passagère de cette zone aortique ou d'une affection propre de son système nerveux dont nous avons montré le développement si étendu.

REMARQUE A PROPOS DE L'EXISTENCE DES CENTRES NERVEUX DANS LES ORGANES

par Y. MANOUÉLIAN

Depuis quelque temps, en parcourant un certain nombre de travaux relatifs à la physiologie et à la bactériologie, — et parmi eux il y en a de fort intéressants — nous avons été frappé de voir que les auteurs négligeaient absolument les centres nerveux périphériques contenus dans les organes. Et cette omission nous paraît si grave que nous avons décidé d'attirer l'attention des auteurs sur ce point, et de présenter quelques réflexions sur ce sujet.

Qu'il nous soit permis de faire remarquer aux expérimentateurs peu au courant d'histo-neurologie, que la conception simpliste d'un système nerveux sympathique central, constitué d'une chaîne ganglionnaire et de nerfs se rendant aux organes, fausserait les résultats de l'expérimentation.

Rappelons-nous que l'histologie a déjà montré l'existence de centres nerveux importants dans un certain nombre d'organes; et il en existe d'autres où leur présence était insoupçonnée : nos recherches personnelles, nous venons de le voir, permettent de l'affirmer. Aussi, quand des physiologistes, de grand mérite d'ailleurs, en étudiant l'action d'un agent sur la sécrétion d'une glande, découvrent que cette action n'est pas influencée par la section des nerfs glandulaires, ils pourraient commettre une erreur en affirmant que le système nerveux n'intervient nullement dans le mécanisme de la sécrétion; car ils élimineraient les centres nerveux intraglandulaires dont l'existence est seulement révélée par l'étude histologique. Pour que leur affirmation fût incontestable, il faudrait prouver que ces centres ne se laissent pas influencer par cet agent.

De même le bactériologiste, qui, après l'inoculation positive d'un organe prélevé dans une maladie infectieuse du système nerveux, affirmerait la virulence ou l'existence d'une toxine dans le tissu *propre* de l'organe, pourrait commettre une erreur pour la même raison que nous venons d'indiquer.

ÉTUDES SUR LE BACILLE DE MALASSEZ ET VIGNAL

LA PSEUDO-TUBERCULOSE DU COBAYE

(MALADIE NATURELLE ET MALADIE EXPÉRIMENTALE)

par G. RAMON

Le bacille de Malassez et Vignal a été aperçu pour la première fois (1884) par ces auteurs, dans un nodule sous-cutané de l'avant-bras d'un enfant mort de méningite tuberculeuse. Il existe dans l'air (Chantemesse, 1887), dans le sol (Grancher et Ledoux-Lebard) et, de ces milieux, il peut passer soit par l'intermédiaire des aliments, soit par tout autre mécanisme, dans des organismes appartenant à des espèces animales très variées. Il y provoque des infections, que l'on a désignées, à cause de leur ressemblance avec celle que détermine le bacille de Koch, sous le nom très général de pseudo-tuberculoses et que l'on peut appeler plus spécialement pseudo-tuberculoses coccobacillaires (1).

On a découvert et décrit les pseudo-tuberculoses coccobacillaires du cheval (Pfeiffer, 1888), du bœuf (Nocard, 1889), du chat (Galavielle, 1898), de la poule (Nocard, 1885), du lapin et du lièvre (Eberth, 1885; Dor, 1888; Lucet, 1898; Lignères, 1889) et, enfin, du cobaye (Eberth, 1885; Charrin et Roger, 1888; Zagari, 1889, etc...). Chez ce dernier animal, la maladie causée par le bacille de Malassez et Vignal présente de gros inconvénients. Le cobaye, en effet, est universellement employé comme sujet d'expérience; or les épizooties de pseudo-tuberculose coccobacillaire, qui se déclarent soit dans les élevages,

1) Il existe en effet d'autres pseudo-tuberculoses dues à divers agents : bactéries, champignons, parasites animaux, matières inertes, etc... Cette dénomination de pseudo-tuberculoses coccobacillaires, qui rappelle l'aspect le plus fréquent du bacille de Malassez et Vignal, dans les lésions et les cultures, nous semble préférable à celle de tuberculose zoogléique (Malassez et Vignal) ou de pseudo-tuberculose streptobacillaire (Dor, Preiz), qui visent seulement une forme particulière du bacille.

soit dans les cages de laboratoire, apportent un trouble considérable dans les recherches. Elles en faussent profondément les résultats, car non seulement les cobayes malades sont plus sensibles aux infections expérimentales, mais encore les animaux meurent en grand nombre et très rapidement. Elles peuvent, en outre, induire en erreur, car les lésions dues au bacille de Malassez et Vignal ressemblent à certaines altérations provoquées par l'inoculation de micro-organismes divers : bacille de la tuberculose, morve, peste, etc... Il importe donc, pour éviter toute confusion avec les symptômes et les lésions de ces dernières infections, de bien connaître les caractères cliniques et anatomopathologiques de la pseudo-tuberculose spontanée. Si cette dernière présente, pratiquement, pour les bactériologistes, beaucoup d'inconvénients, par contre, la pseudo-tuberculose expérimentale peut, au point de vue théorique, offrir quelques avantages. Elle permet d'abord de préciser le mode d'infection dans la pseudo-tuberculose naturelle. D'un autre côté le grand pouvoir pathogène du bacille de Malassez et Vignal pour le cobaye, qui rend si fâcheuse l'affection naturelle, devient précieux lorsqu'il s'agit de la maladie expérimentale, ainsi que nous espérons le montrer dans ce travail.

MALADIE NATURELLE

Notre étude de la maladie naturelle est basée sur l'observation d'une épizootie qui a sévi pendant plusieurs mois sur un élevage de quelques milliers d'animaux et que nous avons pu suivre dans ses moindres détails.

Dès le début l'épidémie présente son maximum d'intensité. Elle atteint de nombreux sujets, sans distinction d'âge ni de sexe. Les malades offrent presque immédiatement des symptômes graves, entraînant une mort rapide. L'autopsie révèle des lésions septicémiques ou aiguës peu caractéristiques.

Dans une deuxième période, la mortalité est encore très élevée. Pas de symptômes bien nettement visibles d'abord, mais un état général qui devient de plus en plus mauvais. Les altérations variables, quant à leur localisation, sont nettement caractérisées.

Dans la dernière période, la mortalité a beaucoup diminué.

Les jeunes succombent de préférence, alors que les adultes paraissent résister. Les lésions sont toujours bien caractérisées, mais elles semblent n'avoir aucune tendance à l'envahissement.

SYMPTÔMES

La pseudo-tuberculose coccobacillaire du cobaye peut affecter au point de vue clinique les trois types suivants :

Type septicémique. — Le cobaye sain, en apparence tout au moins, est pris brusquement de symptômes graves. Immobile dans un coin de sa cage, le dos voûté, le poil hérissé, il est seulement agité de temps à autre par quelques tremblements ou bien par les mouvements liés à la dyspnée, qui augmente constamment d'intensité et qui s'accompagne de plaintes facilement perceptibles. Bientôt l'animal, resté debout jusque-là, se couche, et c'est alors l'asphyxie rapide, la mort vingt-quatre ou quarante-huit heures après l'apparition des premiers signes de la maladie.

Type classique. — Les symptômes sont au début peu marqués ; ce qui attire surtout l'attention c'est un amaigrissement progressif : en peu de temps, le cobaye est réduit à l'état de squelette ; son rachis est en lame de couteau, son poil piqué et si l'on palpe le ventre, qui est flasque et mou, on peut sentir, noyées au milieu des anses intestinales vides d'aliments, de petites masses arrondies correspondant à des ganglions mésentériques hypertrophiés. L'animal finit par mourir au bout d'un temps variable (une ou plusieurs semaines), dans un état de cachexie extrêmement prononcé, après avoir présenté dans les derniers jours des symptômes analogues à ceux du type précédent.

Type ganglionnaire. — Nous avons rencontré assez souvent ce type clinique, qui semble correspondre à une marche chronique de la maladie. Il s'agit d'adénopathies de la région sous-glossienne et cervicale. Les ganglions de cette région sont parfois considérablement hypertrophiés et forment, dans certains cas, de véritables paquets volumineux. Ils peuvent s'abcéder et leur contenu se déverse à l'extérieur.

LÉSIONS

Lorsqu'il s'introduit dans un organisme réceptif, le bacille de Malassez et Vignal y provoque presque toujours une lésion réactionnelle particulière : le pseudo-tubercule.

Ces pseudo-tubercules subissent une évolution sensiblement parallèle à celle du tubercule déterminé par le bacille de Koch et, dans la pseudo-tuberculose coccobacillaire comme dans la vraie tuberculose, on trouve tous les intermédiaires entre la granulation miliaire et le nodule franchement caséeux.

Des différents aspects que peuvent présenter les pseudo-tubercules, de leur localisation à tel ou tel organe à l'exclusion des autres, de leur absence complète même, des altérations secondaires que peut provoquer le bacille de Malassez et Vignal dans les tissus, il résulte divers types anatomiques que nous avons rencontrés au cours de nos très nombreuses autopsies.

Forme latente. — Rien, le plus souvent, dans cette forme ne peut faire soupçonner que l'on se trouve en présence de pseudo-tuberculose coccobacillaire. Aucune trace de pseudo-tubercule, mais seulement une légère congestion du poumon, une hypertrophie plus ou moins marquée de la rate et du foie : ce sont là, en somme, les mêmes lésions que celles de la tuberculose type Yersin du lapin. Mais un simple frottis du foie ou de la rate permettra de reconnaître, au lieu du bacille de Koch, celui de Malassez et Vignal.

Forme pleuro-pulmonaire. — Le poumon est envahi par un semis de pseudo-tubercules de dimensions et d'âge variables suivant les cas. Tantôt ils sont à peine visibles, semblables à la granulation grise de Laënnec, tantôt plus développés, ils ont déjà subi un début de caséification. On peut aussi rencontrer des îlots de pneumonie caséeuse.

Les lésions pulmonaires existent rarement seules ; le plus souvent la plèvre est atteinte d'altérations secondaires plus ou moins prononcées : pleurésie simple ou double, avec fausses membranes et exsudat purulent.

Forme digestive. — L'une des plus fréquentes et des plus typiques. Les lésions de l'intestin lui-même, ordinairement localisées aux dernières portions sont, en général, peu accen-

tuées ; elles sont représentées par des pseudo-tubercules ayant leur siège sous la muqueuse, sans que celle-ci soit d'ailleurs touchée par le processus pseudo-tuberculeux ; mais elles sont toujours accompagnées d'altérations ganglionnaires très importantes. Les ganglions mésentériques et principalement les ganglions iléo-cæcaux sont le siège d'une hypertrophie considérable ; leur volume atteint souvent celui d'une noisette et même d'une noix. Le tissu sain semble avoir complètement disparu ; on ne trouve, à l'incision, qu'une substance caséeuse homogène.

Forme hépatico-biliaire. — On trouve habituellement, soit à la surface du foie, soit noyés dans le parenchyme hépatique, des pseudo-tubercules à tous les stades d'évolution : granulations miliaires, pseudo-tubercules en voie de caséification, nodules franchement caséeux. Dans de nombreux cas, la vésicule biliaire elle-même est atteinte, ses parois renferment des pseudo-tubercules peu développés et la bile est remplacée par un liquide purulent.

Forme ganglionnaire. — Cette forme correspond au type clinique décrit sous la même dénomination ; les ganglions de la chaîne cervicale sont très hypertrophiés et ont subi la même transformation caséeuse que les ganglions mésentériques.

Si les lésions sont le plus souvent bien localisées de manière à constituer les types que nous venons d'envisager, elles peuvent aussi être réunies sur le même cadavre ; on trouve alors à l'autopsie de nombreux pseudo-tubercules du foie, de la rate et même du poumon ainsi que des nodules caséeux mésentériques. Les reins sont très exceptionnellement lésés.

Les différentes lésions de la pseudo-tuberculose spontanée, et en particulier dans les divers aspects que présente le pseudo-tubercule au cours de son évolution, peuvent être très facilement confondues avec certaines altérations spécifiques que provoque ou cherche à provoquer l'expérimentateur, chez le cobaye. Aussi l'observateur non prévenu pourra-t-il, s'il s'en tient à un examen superficiel surtout, faire des erreurs de diagnostic grosses de conséquences. Nous nous bornerons simplement à faire connaître quelques caractères propres à la lésion pseudo-

tuberculeuse, sans vouloir entrer dans tous les détails d'un diagnostic différentiel complet.

Les pseudo-tubercules de la maladie de Malassez et Vignal sont moins bien délimités que les tubercules vrais (tuberculeux ou morveux). Le contenu des pseudo-tubercules bien développés est uniformément caséeux et d'une couleur blanc-sale, alors que dans la tuberculose, la morve, la sporotrichose par exemple, s'il est uniformément caséeux, il affecte un ton jaunâtre plus ou moins accusé. L'hypertrophie considérable des ganglions mésentériques, que l'on observe si fréquemment soit seule, soit associée à d'autres lésions, semble pathognomonique de la pseudo-tuberculose ; il en est de même des adénites cervicales.

Mais, dans certains cas douteux où l'examen des lésions ne permettra pas de poser un diagnostic certain, l'expérimentateur devra recourir à un examen microscopique, pour déceler dans les produits pathologiques soit la présence de l'agent spécifique de la maladie qu'il étudie, soit celle du bacille de Malassez et Vignal.

Le bacille dans les lésions. — Les premiers auteurs (Malassez et Vignal, Chantemesse, Nocard, etc...), qui ont étudié la pseudo-tuberculose, ont donné comme caractéristique du bacille, dans les lésions, la zooglée : amas de courts bacilles, formant de longues chaînettes enchevêtrées. Mais on a bien vite reconnu que la zooglée n'était qu'un aspect transitoire et peu fréquent. On la rencontre seulement dans les lésions de cobayes ayant succombé très rapidement, dans notre forme latente par exemple. Mais, dans la plupart des cas, les microbes de Malassez et Vignal se présentent comme de courts bacilles (coccobacilles) soit isolés, soit en petites chaînettes ou bien plus souvent disposés en diplo. Grâce à la présence de vacuoles à la périphérie de chacun des germes en diplo, il en résulte un aspect en « nœud de ruban » très caractéristique (M. Nicolle).

La fréquence du bacille de Malassez et Vignal dans les produits pathologiques est fort variable ; très abondant, par exemple, dans les lésions de la forme latente, ils le sont moins dans les pseudo-tubercules jeunes. Ils deviennent rares, au point de n'être décelés qu'avec difficulté dans les pseudo-tuber-

cules caséeux et peuvent même faire complètement défaut dans les adénites cervicales et mésentériques.

MALADIE EXPÉRIMENTALE

Les quelques auteurs qui se sont préoccupés de reproduire expérimentalement la pseudo-tuberculose ont eu pour objet soit d'étudier les lésions (Grancher, Ledoux-Lebard, Lucet, etc...), soit de jeter un peu de lumière sur l'étiologie de l'affection naturelle (Lignières). Nous-même, nous nous sommes proposé de préciser les conditions d'infection des cobayes, mais nous avons eu surtout pour but l'analyse qualitative et quantitative de la virulence du bacille de Malassez et Vignal. C'est dans cette intention que nous avons isolé, au cours de l'épizootie qui a servi de sujet à notre étude de la maladie naturelle, un certain nombre d'échantillons du bacille. Cet isolement est relativement facile, car si les microbes de Malassez et Vignal sont parfois peu nombreux dans les produits pathologiques, ils y sont presque toujours à l'état de pureté.

Lorsque l'on parcourt les travaux parus sur la pseudo-tuberculose, on est surpris des divergences des auteurs quant aux caractères morphologiques, culturaux ou biologiques du bacille et on serait tenté de croire à des infections différentes (Preiz). Ces caractères s'étant toujours montrés identiques dans les douze échantillons que nous avons spécialement étudiés, on nous permettra de les rappeler succinctement.

RAPPEL DES CARACTÈRES DU BACILLE

Caractères morphologiques. — Le polymorphisme du bacille que nous avons trouvé dans les lésions, nous le rencontrons à nouveau dans les cultures. Dans le bouillon les germes se présentent sous la forme de coccobacilles de 1 à 2 μ de long, soit isolés, soit groupés en longues chaînettes. Ces chaînettes deviennent de plus en plus courtes, à mesure que la culture vieillit.

Sur gélose, le microbe est beaucoup plus fin et plus allongé et tend franchement vers la forme bacillaire.

Le coccobacille de Malassez et Vignal ne prend pas le Gram.

Caractères de culture. — Il pousse facilement sur tous les milieux usuels.

En bouillon peptone ordinaire, dès la huitième ou la dixième heure, apparaissent de très fins flocons, qui s'épaississent par la suite et tombent bientôt au fond du tube. Au bout de quelques jours, tous les flocons se sont déposés; le liquide qui surnage reste clair et à sa partie supérieure se

forme une mince pellicule; celle-ci se fragmente en petites particules, qui sont entraînées à la partie inférieure du tube.

En bouillon Martin, la culture offre les mêmes particularités mais elle est peut-être un peu moins riche.

Sur gélose, le bacille pousse abondamment ; c'est une nappe blanchâtre d'un ton écru. Lorsque la culture est déjà ancienne, elle dégage une odeur assez désagréable.

La gélatine n'est pas liquéfiée ; en strie, il se forme une couche d'un blanc sale, peu épaisse ; en piqûre, la culture apparaît sous forme d'un clou dont la tête seule est bien apparente.

Sur sérum, le bacille se développe suivant une traînée d'un blanc sale, semblable à la culture sur gélose, mais moins abondante.

Sur *pomme de terre*, la culture est beaucoup plus lente que sur les autres milieux ; on observe d'abord une mince couche d'un blanc jaunâtre, qui brunit en vieillissant et prend l'aspect d'une culture morveuse.

Sur *gélose à la pomme de terre*, la culture est relativement pauvre et se fait sous forme d'une pellicule, qui ressemble à celle que l'on obtient en laissant tomber une goutte de bougie dans l'eau.

Caractères biologiques. — Le bacille de Malassez et Vignal ne fait fermenter ni le glucose ni le lactose, ne donne pas d'indol et ne coagule pas le lait ; il aime les milieux glycérinés. C'est un aérobie strict.

Certains auteurs indiquent comme température la plus favorable à la culture du bacille de Malassez et Vignal, celle de 20 degrés. Or nous avons toujours observé qu'à 37 degrés le bacille poussait plus abondamment qu'à 20 degrés.

CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

Le bacille de Malassez et Vignal s'atténuant assez rapidement à l'étuve, afin d'assurer la conservation de nos échantillons, nous avons employé le procédé à la gélatine de MM. Nicolle et Adil-Bey pour le virus de la peste bovine, procédé utilisé avec succès, depuis des années, par Truche et Cotoni dans l'étude du pneumocoque.

A une culture en bouillon Martin de vingt-quatre heures, nous ajoutions deux volumes de gélatine à l'eau physiologique ; après mélange, le tube scellé était placé à la glacière. Nos divers échantillons ont conservé leur activité, même après de longs mois, ainsi que nous avons pu nous en rendre compte par des titrages espacés.

Nous avons toujours employé, pour nos inoculations, des cultures de vingt-quatre heures en bouillon. Nous nous sommes préalablement assuré du peu de toxicité de ces cultures totales. Dans ce but, nous avons injecté, dans les veines de cobayes, 1, puis 2, puis 3 cent. cubes, sans qu'il en résultât de symptômes toxiques apparents. Nous pouvions donc, pratiquement, ne pas tenir compte de la toxine susceptible d'exister dans nos cultures totales ; d'autant plus que les quantités employées couramment dans la mesure de la virulence n'ont jamais dépassé 1/10 de cent. cube. Nous avons toujours rapporté ces quantités au centimètre cube.

Comme matériel animal, nous nous sommes servi de cobayes mâles de 400 à 500 grammes, provenant d'un élevage indemne de pseudo-tuberculose.

Par de nombreux essais préliminaires que nous croyons

inutile de mentionner ici, nous avons comparé la virulence de nos divers échantillons. N'ayant pas trouvé de différence sensible, nous avons pris comme type l'un d'eux, le n° IX, qui nous a servi plus particulièrement dans toutes nos expériences.

Dans nos tentatives d'infection par ingestion comme dans nos inoculations intrapéritonéales, nous n'avons cherché aucune précision quantitative de la virulence ; nous avons réservé, pour le dosage de cette virulence, les voies intraveineuse et sous-cutanée.

INFECTION EXPÉRIMENTALE

Infection par ingestion. — Les cobayes qui absorbent des aliments, sur lesquels on a répandu une petite quantité de culture du bacille de Malassez et Vignal, ne tardent pas à présenter les symptômes de la maladie naturelle. Quatre cobayes, par exemple, reçoivent un repas infecté unique, constitué par un peu de son et de fourrage, arrosés de 4 cent. cubes d'une culture de vingt-quatre heures; ils offrent bientôt tous les signes cliniques du type classique de l'affection spontanée. Ils meurent, tous les quatre, entre le 10e et le 12e jour, dans un état d'émaciation très accusé : le ventre mou, le rachis en lame de couteau. A l'autopsie, les parois de l'iléon et du cæcum sont infiltrées de pseudo-tubercules bien nets, les ganglions mésentériques et, en particulier, ceux de la région iléo-cæcale sont très hypertrophiés, ils atteignent, dans plusieurs cas, la grosseur d'une noisette et sont déjà caséeux en leur centre. Le foie et la rate sont envahis par un véritable semis de pseudo-tubercules miliaires ; quant aux poumons, leur altération est inconstante et consiste, lorsqu'elle existe, en granulations grises. On retrouve ici les lésions que nous avons signalées comme les plus caractéristiques dans la maladie naturelle.

Il est donc certain, comme Lignières en avait déjà émis l'opinion, que l'ingestion d'aliments souillés par le bacille de Malassez et Vignal représente sinon le seul, tout au moins le plus fréquent des modes d'infection du cobaye dans la pseudo-tuberculose spontanée.

Infection par la voie intrapéritonéale. — Le bacille de Malassez et Vignal possède la propriété, qu'il partage d'ailleurs avec

nombre de micro-organismes, bacille de la morve, microbe de Preiz-Nocard par exemple, de provoquer des lésions de vaginalite lorsqu'il est inoculé dans le péritoine du cobaye mâle (Basset).

Dès le 3e ou le 4e jour après l'inoculation de doses de bacilles variant entre 10^{-1} et 10^{-4} (1) cent. cubes, l'attention est attirée par l'œdème qui apparaît au niveau de la peau des bourses. Si l'on cherche à faire rentrer les testicules dans l'abdomen, en exerçant sur eux une certaine pression, on n'y arrive qu'avec difficulté. Cette difficulté augmente les jours suivants et, bientôt, les testicules sont complètement fixés dans le scrotum ; en même temps, les bourses se sont tuméfiées, mais jamais cette tuméfaction n'atteint dans la pseudo-tuberculose l'intensité prononcée qu'on lui connaît dans la morve (M. Nicolle).

Le cobaye a succombé (généralement au bout de 6 à 7 jours) avant qu'une ouverture se soit produite dans le scrotum et ait donné issue, comme cela a lieu avec le bacille morveux ou le Preiz-Nocard, au pus accumulé à ce niveau. Il peut même arriver, si la dose a été suffisante (au minimum 10^{-1} cent. cube) que le cobaye meure prématurément (3e ou 4e jour) et que, dans ces conditions, les lésions génitales n'aient pas eu le temps de faire leur apparition cliniquement.

A l'autopsie, si l'on examine attentivement la région testiculaire, on remarque que les glandes génitales sont intimement soudées à leur enveloppe musculaire, la cavité des bourses contient une petite quantité d'exsudat fibrineux ou caséo-purulent. Outre ces altérations, on trouve une péritonite séro-fibrineuse généralisée ; l'épiploon, rétracté et épaissi, porte à sa surface quelques pseudo-tubercules en voie d'évolution. Le foie et la rate sont parsemés de granulations miliaires à peine visibles ; le poumon est congestionné, et les granulations qu'on y observe dans certains cas restent microscopiques.

Infection par la voie intraveineuse. — Lorsque l'on injecte dans la veine des doses supérieures à 10^{-3} cent. cube, le cobaye ne manifeste, dans les heures qui suivent, aucun symptôme susceptible d'être rapporté à une action toxique de la

(1) Par convention nous employons la notation 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, etc., pour désigner 1/10, 1/100, 1/1.000 de cent. cube.

culture. Dès le 1er ou le 2e jour, apparaissent les signes cliniques qui rappellent ceux que nous avons mentionnés dans le type septicémique de la maladie naturelle : immobilité, dyspnée intense, etc... L'animal succombe 3 ou 4 jours au plus tard après l'injection. Les lésions sont celles de la granulie au début; en examinant à la loupe le foie, la rate et le poumon, qui sont fortement congestionnés, on remarque, à leur surface, de nombreux petits points grisâtres, premier stade des granulations miliaires.

L'apparition des symptômes est plus tardive, l'évolution des lésions plus complète (et, par conséquent, celles-ci mieux marquées) avec des doses inférieures à 10^{-3} cent. cube. Avec 10^{-4} ou 10^{-5} cent. cube, les animaux succombent en général vers le 12e ou le 15e jour. La dose limite est comprise entre 10^{-7} et 10^{-8} cent. cube ; elle est sensiblement supérieure à celle qui amène la mort par la voie sous-cutanée (10^{-9} cent. cube).

Nous n'avons pas observé, dans nos essais, l'éruption pustuleuse qui se manifeste dans certains cas, lorsque l'on injecte dans les veines des microbes virulents, des bacilles de Preiz-Nocard en particulier (Panisset).

Infection par la voie sous-cutanée. — Nous envisagerons successivement la lésion locale que le bacille de Malassez et Vignal provoque au point d'injection et les lésions de généralisation, déterminées par sa diffusion dans l'organisme de l'animal inoculé.

Lésion locale. — Nous prendrons, pour suivre l'évolution de cette lésion, une dose moyenne, 10^{-4} cent. cube par exemple.

Quelques heures après l'inoculation, le liquide injecté s'est résorbé et il ne reste aucune trace de l'opération. Le 2e jour seulement, apparaît un œdème peu étendu, sans modification apparente des téguments. Le 3e jour, l'œdème s'étend en surface et en épaisseur, et son volume peut atteindre celui d'une amande. Du 4e au 5e jour, l'empâtement décroît; du 6e au 7e jour, les téguments s'amincissent et on peut apercevoir une légère fluctuation. Du 8e au 9e jour, l'abcès s'ouvre, par amincissement progressif des téguments : le pus et le bourbillon sous-cutané s'échappent. Le pus continue à s'évacuer pendant les jours suivants; mais la mort survient ordinairement vers le 10e ou le 12e jour.

Avec les doses supérieures ou inférieures à 10^{-4} cent. cubes, le processus est toujours le même; seule, l'intensité varie en plus ou en moins, mais étant donné que cette intensité est réduite, les différences entre les doses voisines sont à peine appréciables; elles ne sont sensibles qu'entre les extrêmes. La dose encore capable de produire une lésion locale est comprise entre 10^{-9} et 10^{-11} cent. cube.

Comme la dose mortelle ne dépasse guère 10^{-9}, les lésions locales, obtenues avec 10^{-10} ou 10^{-11} cent. cube, peuvent guérir et cela par cicatrisation de l'abcès ou même par résorption de l'empâtement initial.

Lésions de généralisation. — La lésion locale provoque toujours un retentissement ganglionnaire sur les ganglions voisins précruraux ou axillaires, qui s'hypertrophient et peuvent devenir caséeux si l'évolution de l'infection est suffisamment lente.

Mais la généralisation n'est pas limitée aux ganglions; elle s'étend aux différents organes ordinairement lésés par le bacille de Malassez et Vignal (sauf l'intestin). Le foie et la rate, les poumons même sont envahis par un semis de pseudo-tubercules à peine visibles et extrêmement nombreux lorsque la dose a été forte et la mort rapide, plus développés et moins nombreux si la dose a été plus faible et, par conséquent, la mort plus lente.

La mort survient dans des délais variables; grâce à nos nombreuses inoculations nous pouvons donner les chiffres suivants sans prétendre d'ailleurs à une exactitude mathématique :

10^{-1} à 10^{-3}	8 à 10 jours.
10^{-3} à 10^{-4}	10 à 12 jours.
10^{-4} à 10^{-7}	12 à 15 jours.
10^{-7} à 10^{-9}	15 à 30 jours.

Comme on le voit, la virulence du microbe de Malassez et Vignal est excessivement marquée chez le cobaye. Des doses infimes de culture déterminent par la voie sous-cutanée, non seulement une lésion locale typique, mais encore une généralisation au niveau des organes de prédilection.

TRAITEMENT VACCINOTHÉRAPIQUE DE LA FIÈVRE TYPHOIDE

par E. BOINET,

Professeur de Clinique médicale, Médecin en chef des Hôpitaux,
Correspondant national de l'Académie de médecine.

(DEUXIÈME PARTIE)

II

Depuis la rédaction des observations qui précèdent, j'en ai fait un certain nombre d'autres, dont voici le résumé :

Dans cette série de 28 cas de fièvre typhoïde observés chez des hommes (salle Ducros, à l'Hôtel-Dieu) et confirmés par un séro-diagnostic positif à 1/100, nous avons eu 25 guérisons qui suggèrent les considérations suivantes :

Durée de la maladie. — La guérison est survenue 7 fois du 12e au 17e jour, 3 fois au 20e jour, 4 fois du 21e au 24e jour. La durée de ces fièvres typhoïdes traitées par le virus sensibilisé de Besredka a donc été abrégée dans 14 cas et très nettement dans 10.

Nous relevons encore 2 cas de guérison au 29e jour, 4 du 30e au 37e jour, 4 du 40e au 49e jour.

On peut citer comme exemple de l'action favorable du virus sensibilisé de Besredka, dans cette seconde série : l'observation I où l'injection de 4 cent. cubes de virus sensibilisé à partir du 7e jour fut suivie d'apyrexie le 12e jour ; l'observation VI dans laquelle la guérison survint le 13e jour après l'injection de 3 cent. cubes de virus sensibilisé faite en 2 fois, les 10e et 12e jours ; l'observation VII où la convalescence arriva le 17e jour après une injection de 2 cent. cubes 1/2 faite du 11e au 16e jour ; l'observation VIII où des injections d'une quantité globale de 3 cent. cubes 1/2 de virus sensibilisé espacées du 10e au 20e jour amenèrent la guérison le 20e jour ; l'observation XIII

Deuxième série de cas de fièvre typhoïde traités par le virus sensibilisé de Besredka.

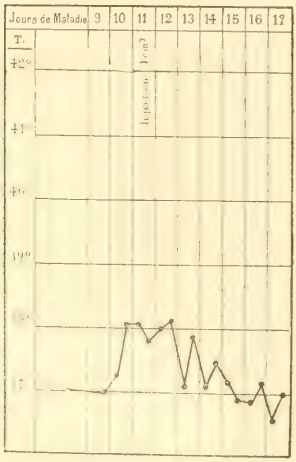
OBSERVATIONS	DÉBUT du traitement	DOSES	JOURS DE MALADIE	DURÉE du traitement	RECHUTES	COMPLICATIONS	MORT	REMARQUES
I.	7e jour.	1 c.c les 7e et 9e j. 2 c.c. le 11e j., soit : 4 c.c.	12 jours	5 jours.	»	»	»	Séro-réaction de Widal positive à 1/100.
II.	10e jour.	1 c.c. les 10e et 11e j., 2 c.c. le 12e j., 3 c.c. les 13e et 14e j., soit : 10 c.c.	29 jours	5 jours.	»	Vomissements, épistaxis le lendemain de la 2e inject.	»	Id.
III.	11e jour.	1 c.c.	14 jours	1 jour. Améliorat. 2 j. après l'inject.	»	»	»	Id.
IV.	17e jour.	1/2 c.c. le 17e j., 1 c.c. les 18e et 22e j., soit : 2 c.c. 1/2.	23 jours	6 jours.	»	»	»	Id.
V.	13e jour.	3/4 c.c. le 13e j., 1 c.c. le 19e j.	21 jours	7 jours.	»	»	»	Id.
VI.	8e jour.	1 c.c. 1/2 les 10e et 12e j., amélioration très marquée après chaque injection.	13 jours	3 jours.	»	»	»	Id.
VII.	11e jour.	1/2 c.c. le 11e j., 3/4 c.c. le 12e j., 1/2 c.c. le 13e j., 1/2 c.c. le 15e j., 1/4 c.c. le 16e j., soit : 2 c.c. 1/2.	17 jours	6 jours.	»	»	»	Id. Légère réaction au niveau de l'injection le lendemain de la 1re (température entre 38°3 et 38°6) et à la 3e (température entre 37°8 et 39°).
VIII.	10e jour.	1/2 c.c. le 10e j., 3/4 c.c. le 12e j., 1/2 c.c. les 16e et 17e j., 1/4 c.c. les 18e, 19e, 20e j., soit : 3 c.c. 1/2.	20 jours	11 jours	»	»	»	Séro-réaction positive à 1/100. Réaction locale après les 1re, 2e, 4e injection.
IX.	15e jour.	1 c.c. les 15e et 18e j.	30 jours	4 jours.	»	»	»	Séro-réaction positive à 1/100. Réaction locale vive avec rougeur et douleur après la 1re injection.
X.	5e jour.	3/4 c.c.	Chute de température de 1°4 et retour à la normale le lendemain de l'injection.	1 jour.	»	»	»	Séro-réaction positive à 1/100.
XI.	11e jour.	3/4 c.c.	20 jours	1 jour.	»	»	»	Id.
XII.	18e jour.	1/2 c.c.	20 jours	1 jour.	»	»	»	Id.
XIII.	7e jour.	1/2 c.c.	14 jours	1 jour.	»	»	»	Id. Amélioration très considérable à dater du 10e jour.
XIV.	22e jour.	3/4 c.c.	24 jours	1 jour.	»	»	»	Séro réaction positive à 1/100.
XV.	18e jour.	1/4 c.c. le 18e j., 1/2 c.c. le 19e j., 1/4 c.c. les 21e, 22e, 23e et 26e j., soit : 1 c.c. 3/4.	37 jours	9 jours.	»	»	»	Id. Réaction locale après les 3 premières injections.
XVI.	17e jour.	1 c.c.	19 jours	1 jour.	»	»	»	Séro-réaction positive à 1/100.
XVII.	7e jour.	1 c.c.	47 jours	1 jour.	»	»	»	Id.
XVIII.	9e jour.	1/2 c.c.	16 jours	1 jour.	»	»	»	Id.
XIX.	10e jour.	1/2 c.c. le 10e j., 1/2 c.c. le 11e j.	22 jours (apyrexie)	2 jours.	»	»	»	Id. Id. Amélioration sensible de l'état général après la 2e injection.
XX.	12e jour.	1/2 c.c. le 12e j., 1/4 c.c. le 13e j.	31 jours	2 jours.	du 38e j. au 40e j.	»	»	»
XXI.	11e jour.	1/4 c.c. les 11e et 13e j.	15 jours apyrexie)	2 jours.	du 16e j. au 24e j.	»	»	Séro-réaction positive à 1/100.
XXII.	14e jour.	1 c.c. les 14e, 23e et 27e j.	29 jours	13 jours.	les 31e et 35e j.	»	»	Id.
XXIII.	32e jour.	1 c.c.	40 jours (apyrexie)	1 jour.	du 43e j. au 50e j.	»	»	Id. Hémorragies abondantes des gencives, hémophilie à la première rechute.
XXIV.	14e jour.	1 c.c. les 14e et 15e j., 1/2 c.c. le 17e j., 1 c.c. le 21e j., soit : 3 c.c. 1/2.	41 jours	8 jours.	»	Hémorragie intestinale le 31e jour.	»	Séro-diagnostic positif à 1/100.
XXV.	15e jour.	1 c.c. les 15e, 23e, 28e et 33e j.	34 jours (apyrexie)	»	du 35e j au 48e j.	Phlébite de la fémorale.	»	Id.
XXVI.	10e jour.	1 c.c.	»	»	»	»	le 15e jour	Forme ataxo-adynamique très grave d'emblée.
XXVII.	7e jour.	3/4 c.c. le 7e j., 1/2 c.c. le 9e et 11e j., 1 c.c. le 14e j.	»	»	»	Hémorragies intestinales les 22e et 27e jours.	le 29e jour	Purpura, larges plaques ecchymotiques superficielles et profondes au membre inférieur droit et au gros orteil gauche, 48 heures avant la mort.
XXVIII.	13e jour.	1/2 c.c. les 15e et 16e j.	»	2 jours.	»	»	le 21e jour	Forme délirante extrêmement grave.

dans laquelle une injection de virus sensibilisé faite le 7e jour détermina une amélioration considérable le 10e et la guérison le 14e jour de la maladie ; l'observation XVIII où une injection de virus sensibilisé pratiquée le 9e jour entraîna la guérison le 16e.

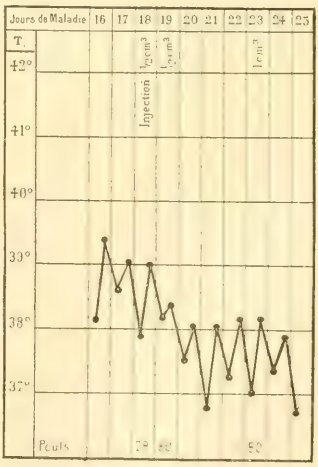
Réaction locale. — Elle s'est produite au niveau de l'injection dans les observations VII (guérison le 17e jour), VIII (guérison le 20e jour), XII (guérison le 20e jour) ; elle est considérée comme d'un bon pronostic ; cependant elle fut vive dans un cas rapidement mortel, à forme délirante (observation XXVIII) et légère, après la 2e injection, dans le cas XXVII suivi de mort le 29e jour.

Température. — L'action du virus sensibilisé de Besredka sur la température des typhiques guéris de la seconde série a été la suivante :

Dans l'observation I, après les injections de 4 cent. cubes de virus sensibilisé commencées le 7e jour (1 cent. cube), continuées le 9e (1 cent. cube), le 11e jour (2 cent. cubes), l'apyrexie se manifesta le 12e jour. Dans l'observation III, la convalescence



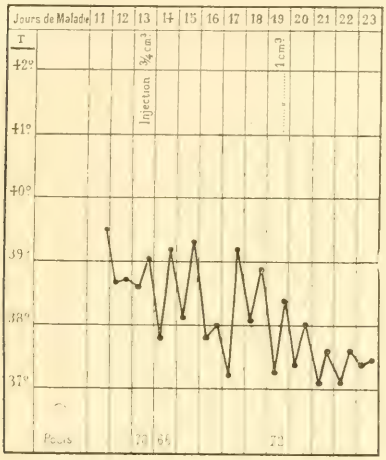
Obs. III'.



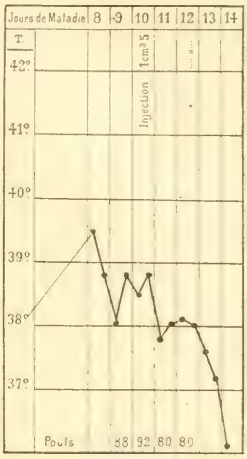
Obs. IV'.

se produisit 5 jours après une injection de virus sensibilisé (1 cent. cube), faite au 11e jour de la maladie.

On voit dans l'observation VI la courbe tomber à la normale 2 jours après une seconde injection de 1 cent. cube 1/2 de



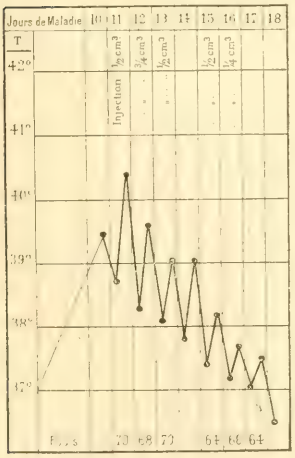
Obs. V'.



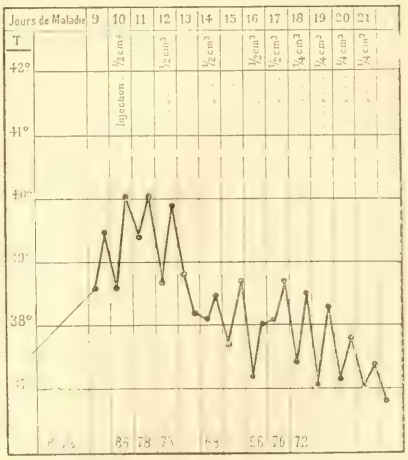
Obs. VI'.

virus sensibilisé et la convalescence survenir au 13e jour.

La guérison arriva le 17e jour dans l'observation VII après

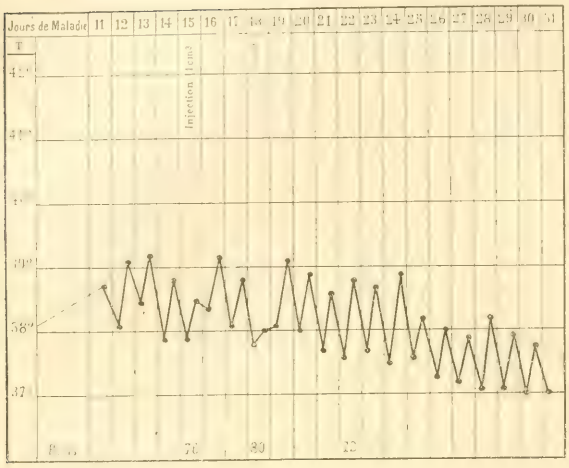


Obs. VII'.

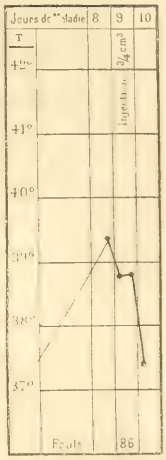


Obs. VIII'.

5 injections de petites quantités de virus sensibilisé représentant 2 cent. cubes 1/2 et commencées le 11e jour. Dans l'observation VIII, 3 cent. cubes 1/4 de virus sensibilisé injectés en

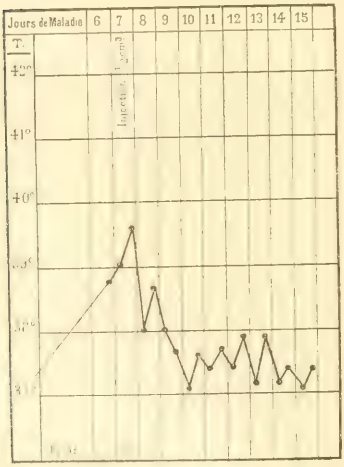


Obs. IX'.

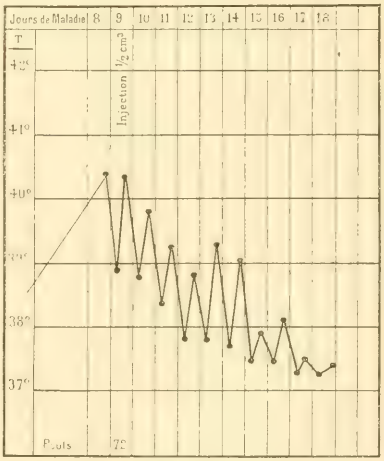


Obs. X'.

8 fois à partir du 11e jour de la maladie déterminèrent l'apparition de la convalescence le 20e jour. Dans l'observation XIII,



Obs. XIII'.

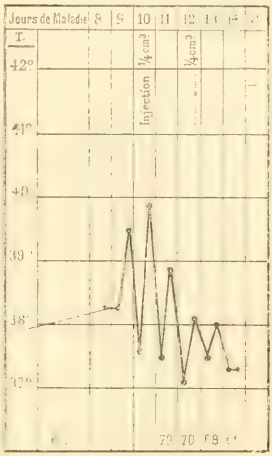


Obs. XVIII'.

une faible dose (1/2 cent. cube de virus sensibilisé) injectée le 7e jour provoque une amélioration très considérable 3 jours plus tard et la convalescence au 14e jour de la maladie.

L'injection tardive de doses trop faibles et trop espacées ne paraît pas empêcher les rechutes. Il y a donc intérêt, dès que

le diagnostic clinique est confirmé par la séro-réaction et l'hémoculture, d'injecter le plus tôt possible ce virus sensibilisé qui provoque rapidement des réactions humorales de l'organisme. Il est prudent de commencer par une dose faible ou moyenne et de s'abstenir, quand le malade a une rechute ou s'il se trouve à une période trop éloignée du début. Si le typhique est résistant, possède une bonne tension, sans tare organique, on peut répéter tous les deux jours des injections de doses croissantes sans dépasser la limite globale de 10 à 11 cent. cubes de virus sensibilisé de Besredka pour tout un traitement vaccinothérapique.



Obs. XXI.

Décès. — Sur les 28 cas de la seconde série de fièvre typhoïde traités par le virus sensibilisé de Besredka, les 3 décès survenus ne sont pas imputables à cette vaccinothérapie, ainsi que le montrent les détails cliniques suivants :

Le XXVIe cas, entré dans le service pour une forme ataxo-adynamique très grave, ne reçoit qu'une injection sous-cutanée de 1 cent. cube de virus sensibilisé, le 10e jour. La mort arrive le 15e jour.

Le XXVIIe cas est traité par des injections de 2 c. c. 3/4 de virus sensibilisé, faites en 4 fois, du 7e au 14e jour ; deux hémorragies intestinales se produisent les 22e et 27e jours, et le malade meurt le 29e jour avec du purpura, des ecchymoses profondes dans le membre inférieur droit.

Le XXVIIIe cas concerne un marin arrivé dans le service en plein délire, avec des contusions multiples, agitation nécessitant l'emploi de la camisole de force. On lui fait 2 injections de 1/2 cent. cube les 15e et 16e jours de la maladie. Il meurt 4 jours après, en plein délire.

Contre-indications. — La conclusion à tirer de ces derniers faits suivis de mort est que cette vaccinothérapie ne doit pas être employée dans les fièvres typhoïdes graves, hyperpyrétiques, délirantes, à forme ataxo-adynamique, s'accompagnant

de diminution notable de la tension, de faiblesse et d'irrégularité cardiaques ou ayant entraîné des complications, telles que l'hémorragie intestinale, la perforation intestinale, la cholécystite. Les contre-indications et les complications doivent faire renoncer à ce traitement vaccinothérapique.

Il sera utilement associé à la médication adjuvante classique : bains tièdes, spartéine (de 0,05 à 0,10 centigrammes par jour), adrénaline, XX gouttes par jour, urotropine, etc., suivant les indications cliniques.

En somme, ce traitement vaccinothérapique de la fièvre typhoïde a donné 47 guérisons; il a été impuissant dans 7 cas de fièvre typhoïde à forme ataxo-adynamique délirante, hyperthermique entrés dans le service dans un état désespéré.

Pour avoir un terme de comparaison, nous avons fait relever les cas de fièvre typhoïde traités, en 1913, à l'Hôtel-Dieu de Marseille, dans les trois services de médecine, par la méthode classique ordinaire. On compte 303 cas de fièvre typhoïde guéris, et 67 décès. Cette mortalité de 22 p. 100 tient à ce que l'on ne reçoit, faute de place souvent, que les typhiques graves (1).

De plus, la fièvre typhoïde a déterminé dans un seul service 16 décès répartis ainsi : par hémorragie intestinale, 4; par perforation intestinale, 2; par forme ataxo-adynamique, 7; par complications méningées, 2; par mort subite, 1.

La durée des 63 cas guéris par le traitement classique a été dans 4 cas (17, 19, 21, 21 jours); dans 10 cas (22, 22, 23, 24, 24, 25, 27, 28 jours trois fois); dans 24 cas (30 jours, 7 fois; 34 jours, 2 fois; 35 jours, 2 fois; 36 jours, 9 fois; 37, 38 jours, 3 fois); dans 19 cas (41 jours, 6 fois; 42, 43, 44 jours, 2 fois; 45 jours, 3 fois, 46, 48 jours, 3 fois, 50 jours, 2 fois).

Enfin, 6 cas ont exceptionnellement duré 60 jours, 2 fois, 77, 87, 99, 118 jours avec diverses complications et rechutes.

En résumé, ces chiffres comparatifs montrent les bons effets du traitement de la fièvre typhoïde par le virus sensibilisé de Besredka, quand il est appliqué d'une façon précoce, prudente et judicieuse.

(1) La fièvre typhoïde est fréquente et grave à Marseille, puisque la statistique municipale porte, pour 1913, 1.791 cas de fièvre typhoïde et 293 décès (soit une proportion de 17 p. 100 de mortalité). Ces chiffres montrent la nécessité de la vaccination préventive.

ÉTUDES SUR LA RICINE

III. — HYPERSENSIBILITÉ A LA RICINE

par E. ALILAIRE.

L'abrine détermine, chez l'homme, une inflammation oculaire bien connue, *après incubation*, quand on la dépose sur la conjonctive. On peut affirmer que la ricine agirait de même, mais avec moins d'intensité (il en va ainsi chez les animaux). Or nous jouissons du singulier privilège de réagir, violemment et *sans incubation*, à des traces de ricine. Ce *cas personnel d'hypersensibilité* nous a paru mériter d'être signalé.

Voici en quoi consistent les accidents. Lorsque l'on débouche, au loin et sans nous prévenir, un flacon contenant de la ricine sèche, *a fortiori* quand nous inhalons des traces de cette toxine, apparaissent presque immédiatement des *symptômes identiques à ceux de la fièvre des foins*.

Tout d'abord, c'est un picotement à l'angle interne des yeux, accompagné de photophobie et suivi de rougeur et d'œdème des conjonctives, ainsi que d'une abondante sécrétion lacrymale. En même temps, démangeaisons intranasales, éternuements violents et répétés, sensation d'obstruction, puis véritable flux séro-muqueux. Très souvent, un accès d'asthme type se surajoute au catarrhe oculo-nasal (toux, dyspnée expiratrice, anxiété précordiale) ; très souvent, aussi, une éruption ortiée envahit la face et le cou, avec formation de vésicules au bord des lèvres.

Si nous déposons, sur le dos de la main et sans frotter, une trace de la solution glycérinée de ricine (employée dans les expériences de MM. Nicolle et Cesari), nous éprouvons, très vite, une démangeaison intense, suivie de l'apparition d'une rougeur et d'une plaque urticarienne. Même résultat, si nous coupons en deux une graine de ricin et que nous appliquions la surface de section sur la peau.

Notre *hypersensibilité* est donc *typique*. Des traces d'une « toxine à incubation » déterminent, chez nous, des accidents violents et immédiats. Comme les personnes atteintes de fièvre des foins, nous n'avons aucune phase d'immunité, même temporaire ; comme elles, nous bénéficions de l'antitoxine spécifique. Le sérum antiricinique, préparé par Truche et étudié dans les mémoires précédents, « coupe », en effet, l'attaque aiguë quand on l'introduit, au début, dans les fosses nasales.

Notre *hypersensibilité* doit être considérée comme *acquise*, bien qu'elle se soit développée insidieusement et soit apparue tout d'un coup dans sa plénitude. Durant les années 1907 et 1908, nous avons préparé en grand de la ricine, sans jamais ressentir le moindre symptôme anormal. Nous sommes allé, ensuite, en Amérique pendant un an. A notre retour, nous avons voulu continuer nos recherches et l'éclosion inopinée des accidents décrits plus haut ne l'a pas permis.

Cette hypersensibilité tient-elle au fait que nous sommes sujet à la fièvre des foins ? Il est possible qu'une première susceptibilité anormale favorise le développement d'une seconde ; c'est même fort admissible. Mais, ainsi que nous l'ont montré les résultats négatifs, obtenus chez plusieurs personnes sujettes à la fièvre des foins, la réaction aux toxines polliniques n'entraîne pas du tout la réaction à la ricine. On sait, d'ailleurs, que les sujets atteints du catarrhe estival ne sont sensibles, naturellement et expérimentalement, qu'aux pollens des graminées (très rarement aux pollens de *solidago* et d'*ambrosia*) et que les sujets atteints du catarrhe automnal ne sont sensibles qu'aux pollens de *solidago* et d'*ambrosia*. Dans le même ordre d'idées, nous mentionnerons que l'application d'abrine ou de crotine sur la peau ne détermine, chez nous, aucune réaction locale. Notre *hypersensibilité* à la ricine est donc bien *spécifique*.

Rappelons, à titre de curiosité, que des accidents, beaucoup plus rares que la fièvre des foins (et reconnaissant aussi vraisemblablement pour cause une sensibilité anormale à des toxines), ont été signalés chez des gens qui s'étaient trouvés en contact, médiat ou immédiat, avec certaines plantes, notamment les *primevères*. Bornons-nous à citer le fait suivant. Nestler

s'applique, sur la peau, un pétiole de *primula obconica* (primevère de Chine) et voit apparaître une dermite eczématoïde ; Dubreuihl ne peut reproduire les mêmes accidents, sur lui-même, ni avec cette variété, ni avec la *primula cortusoïdes* (primevère de Sibérie).

Notons enfin, en terminant, que sur des centaines de personnes, examinées obligeamment par MM. Vallery-Radot et Gutman, *aucune* n'a réagi à la ricine. L'hypersensibilité à la ricine *semble* avoir été observée dans les huileries marseillaises, mais les renseignements que l'on nous a fournis sont trop incomplets pour entraîner d'emblée la conviction.

TENEUR BACILLAIRE
ET CONDITIONS DE PULVÉRISABILITÉ DE LA SALIVE
ET DES CRACHATS TUBERCULEUX
PAR LES COURANTS AÉRIENS

par P. CHAUSSÉ.

(PREMIER MÉMOIRE)

Dans l'historique de la contagion par les particules liquides (1), nous avons rappelé que Nægeli, Nægeli et Büchner, et Wernich, ont tenté de déterminer les conditions de pulvérisabilité de certains liquides sous l'influence des courants aériens. De ses recherches Naegeli concluait que « de la surface d'un liquide bactérien l'évaporation, et même le vent fort, ne détachent aucun germe aussi longtemps qu'il n'y a pas formation de vagues et pulvérisation d'une fraction du liquide sous forme de gouttelettes ».

A de légères différences près, Nægeli et Büchner, puis Wernich, ont confirmé cette constatation.

Dans son premier mémoire *Sur l'infection de l'air*, publié en 1897 (2), Flügge, opérant avec une dilution de *bac. prodigiosus*, fait arriver à la surface du liquide, sous un angle de 45 degrés, un courant d'air; ce gaz passe ensuite dans des tubes de verre dont la paroi interne est enduite de lévulose stérile destiné à fixer, s'il y a lieu, les germes détachés; le lévulose est dissous et ensemencé à la fin de l'expérience. L'auteur constate qu'une vitesse de déplacement de l'air, égale à 4 mètres par seconde, suffit à faire mousser l'eau et à en pulvériser une petite quantité sous forme de gouttelettes transportables. Il se croit autorisé à déduire de cette expérience que, dans les conditions naturelles, les lacs, fleuves et océans laissent se détacher, sous l'action du vent, des particules bactériennes qui sont transportées; il pense aussi que cela est réalisé dans l'habita-

tion bien plus souvent qu'on ne le suppose : quand on verse un liquide dans un autre, quand on lave les parquets, quand un jet liquide rencontre une surface ferme, et enfin *quand on parle, tousse ou éternue.*

A l'appui de cette dernière assertion, Flügge fait connaître qu'un de ses collaborateurs, le Dr Laschtschenko, dans des recherches jusque-là inédites, a pu se rendre compte, en mettant dans sa bouche une dilution de *bac. prodigiosus*, et en parlant, toussant ou éternuant en face de milieux de culture, de la projection de gouttelettes à des distances de plusieurs mètres.

Ce sont ces recherches qui conduisent le savant allemand à émettre prématurément, avons-nous dit, sa théorie de la contagion tuberculeuse par les particules liquides.

Toutefois Flügge ne peut se dérober à la nécessité de reconnaître, car cela est de toute évidence, que « des recherches directes, avec les crachats tuberculeux mêmes, doivent être faites pour savoir si les gouttelettes obtenues par leur pulvérisation sont aussi aisément, ou un peu moins aisément transportables, que celles libérées par une dilution de *bac. prodigiosus* » (page 215). La même année (3), dans une autre publication, il se demande à nouveau, non sans raison, si « les crachats du phtisique, plus consistants que la dilution aqueuse ci-dessus, peuvent donner lieu à une pulvérisation fine ».

Un commencement de preuve, dans le sens de la thèse de Flügge, fut apporté deux ans plus tard, par l'un de ses élèves, déjà cité, le Dr Laschtschenko (4). Ce dernier se proposa de rechercher si le barbotage de l'air, dans des crachats tuberculeux, détache des bacilles. Dans ce but dix parties de crachats furent additionnées d'une à deux parties d'eau, et, par aspiration, on fit passer dans cette dilution, *pendant une heure*, un courant d'air dont la vitesse était de 6 à 10 millimètres par seconde ; l'air traversait ensuite une solution physiologique stérile de NaCl ; l'expérience terminée, on centrifugeait cette solution et on examinait le dépôt *au microscope*. Le résultat de cet examen fut positif cinq fois sur cinq. En répétant trois autres fois la même expérience, avec des crachats non dilués, *pendant deux et quatre heures*, il y eut trois résultats

positifs, dont deux par l'examen microscopique et un par l'inoculation dans le péritoine du cobaye.

Ce sont ces travaux, corroborés par d'autres que nous avons analysés dans l'historique plus complet de cette question, notamment par ceux de Sticher, Beninde, Heymann, Mœller, Nenninger, Paul, etc., qui ont servi de base à la théorie de la contagion par les gouttelettes, laquelle est aujourd'hui adoptée par le monde médical. Ne voulant pas entrer dans de nouveaux développements à ce sujet nous prions le lecteur de se reporter, s'il le juge nécessaire, à notre précédent article.

Au cours d'expériences sur la tuberculose par inhalation nous avons constaté, il y a quelques années, que l'interprétation de Flügge ne peut s'accorder avec certaines propriétés des particules liquides et des poussières. C'est alors que nous avons pris connaissance des travaux de cet auteur et de ceux de ses élèves, et il nous est apparu que la théorie de la « Tröpfchen-infection » n'est autre chose qu'une hypothèse, pouvant renfermer sans doute une part de vérité.

Dès ce moment nous nous proposâmes de procéder à de nouvelles investigations pour éclairer si possible les modes et les conditions de la contagion tuberculeuse par inhalation.

Comme recherche préliminaire, avant d'aborder l'étude de la contagion avec le malade, il nous a semblé nécessaire d'acquérir quelques notions sur les conditions de pulvérisabilité de la salive et des crachats tuberculeux, sous l'action des courants aériens, étant donné que ce sont là les deux liquides susceptibles de réaliser la transmission par les gouttelettes.

Mais une question préalable se pose encore : quelle est la teneur bacillaire de la salive? Le liquide buccal est le moins consistant, le plus pulvérisable, si on le compare au crachat d'origine pulmonaire ; c'est sans doute lui qui sera, si la thèse de Flügge est exacte en totalité ou en partie, le véhicule habituel du contage ; il est donc utile de rechercher tout d'abord s'il est virulent dans les intervalles de la toux et du crachement, et dans quelle mesure il est dangereux. C'est pourquoi nous examinerons rapidement, en premier lieu, les teneurs bacillaires des crachats et de la salive ; nous nous occuperons ensuite de leurs conditions de pulvérisabilité.

Teneur bacillaire des crachats. — Nous avons indiqué, dans une note précédente (5), une méthode de numération des bacilles dans les crachats ou la matière caséeuse : on fait une dilution à un titre connu ; on en étale un poids déterminé sur une surface rectangulaire ; on laisse sécher horizontalement, puis on fixe par la chaleur, et enfin, on colore au Ziehl. La numération des bacilles est faite à l'aide d'un oculaire quadrillé ; un calcul élémentaire donne la teneur en bacilles rapportée au milligramme de produit frais.

Cette méthode nous a permis de nous rendre compte que, chez le phtisique à la troisième période, les teneurs les plus courantes sont de 5.000 à 30.000 bacilles par milligramme de crachats ; chez une partie des malades on peut compter de 30.000 à 100.000, et même 120.000 bacilles par milligramme, et ces chiffres élevés se maintiennent parfois plusieurs mois, et même un ou deux ans, avant l'issue fatale. La richesse des expectorations en bacilles est du reste susceptible de varier en quelques jours chez le même malade. Les tuberculeux que nous avons utilisés pour nos recherches ont été généralement choisis parmi les plus contagieux, c'est-à-dire ceux dont les mucosités étaient les plus riches en bacilles et qui crachaient le plus.

Le danger du crachat sera donc considérable, s'il est divisé et projeté dans l'atmosphère sous une forme respirable. Nous avons déjà montré que ce danger est fort important après dessiccation (6), mais cela ne peut exclure, sans plus ample informé, la possibilité, et peut-être la prééminence de la contagion par les gouttelettes.

Teneur bacillaire de la salive. — La richesse bacillaire de la salive a fait l'objet de recherches de la part de Weyssmayr (1898) (7) ; chez six malades dont les expectorations contenaient l'agent causal en abondance, cet auteur procéda à des examens microscopiques dont voici le résultat sommaire :

Phtisique n° 1 : on a fait 5 préparations de salive sans trouver de bacilles ;
Phtisique n° 2 : 4 préparations de salive, pas de bacilles ;
Phtisique n° 3 : 3 préparations de salive, 1 bacille dans 1 préparation ;
Phtisique n° 4 : 2 préparations de salive, 1 bacille ;
Phtisique n° 5 : 2 préparations de salive, 15 et 24 bacilles ;
Phtisique n° 6 : 3 préparations de salive, 1 bacille.

Examinant simultanément le mucus pharyngien de quelques autres malades, Weyssmayr y décèle également très peu de bacilles de Koch, bien que ceux-ci soient nombreux dans les crachats.

Nous avons récemment procédé à des examens analogues pour la salive de vingt phtisiques pris parmi les plus contagieux; dans des recherches de cette nature, ne visant qu'à une approximation très large, l'examen microscopique s'est montré suffisant pour renseigner.

Il est évident *a priori* que la salive pure ne peut être que très rarement bacillaire; mais la salive buccale est mélangée à tout instant à une proportion variable de mucosités venant des voies respiratoires; sa richesse en bacilles peut donc varier selon le moment où elle sera recueillie, avant ou après l'expectoration, et selon l'abondance de cette expectoration. Si le malade crache peu et rarement le liquide buccal aura le temps de se purifier des bacilles, par déglutition, dans l'intervalle de chaque émission.

Voulant comparer la salive et les crachats tels qu'ils existent dans les conditions ordinaires de la vie du tuberculeux le plus contagieux, au sens de Flügge, nous avons recueilli des échantillons des deux produits sans recommander aucune précaution particulière; il eût été contre-indiqué de prélever de la salive, par exemple, après rinçage de la cavité buccale.

La salive que nous avons obtenue contenait presque toujours des fragments de muco-pus bronchique, visibles à l'œil nu, les malades choisis toussant et crachant beaucoup.

Sur 20 malades, l'examen microscopique fut négatif 13 fois; dans les 7 cas positifs, la quantité de bacilles trouvée dans la salive fut de 120 à 25.000 fois plus faible que dans les crachats des mêmes malades. Il est évident que l'examen microscopique négatif n'exclut pas la virulence. Les sujets chez lesquels nous avons trouvé le plus de bacilles dans la salive, sont généralement décédés peu de temps après; la présence d'un nombre élevé de microbes tuberculeux dans la bouche indique, en effet, nécessairement l'abondance des expectorations et un état général très mauvais qui peut cependant se prolonger plusieurs semaines.

De ceci nous devons conclure que la salive du tuberculeux

dont les expectorations sont riches en bacilles, est *constamment virulente*. Si le malade expectore peu et à intervalles éloignés, ce liquide peut certainement se montrer dépourvu de bacilles de Koch. On peut dire approximativement que la teneur de la salive en bacilles est de 100 à 100.000 fois plus faible que celle des crachats, ce qui en atténue considérablement la nocivité. Il faut considérer aussi que les plus grosses particules respirables, celles de 20 microns de diamètre par exemple, pèsent environ 1/300.000 de milligramme, tandis que les plus fines pèsent 1/10.000.000 à 1/20.000.000 de milligramme; par conséquent la grande majorité des particules salivaires, et les plus dangereuses, si elles se forment dans les conditions naturelles, sont dépourvues de virulence.

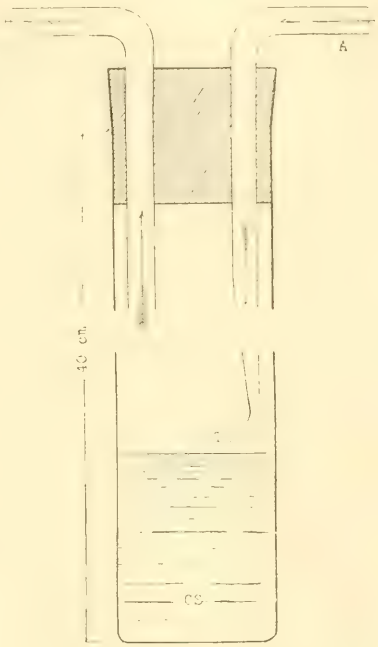


Fig. 1. — *Schéma du dispositif employé pour l'épreuve de la ventilation superficielle.*

A, tube d'arrivée de l'air fourni par une soufflerie; CS, crachats ou salive bacillaires; T, petit tube amenant l'air, sous un angle de 45 degrés, à la surface du liquide; S, tube de sortie de l'air se rendant dans la caisse à inhalation.

Conditions de pulvérisabilité. — Pour connaître la pulvérisabilité par le contact de l'air en déplacement, nous avons employé deux méthodes : la ventilation superficielle et la ventilation profonde ou barbotage.

La ventilation superficielle était pratiquée de la manière suivante : dans un tube-flaconde 27 ou de 35 millimètres de diamètre sur 40 centimètres de hauteur, fermé par un bouchon de caoutchouc à deux orifices, nous déposions environ 20 grammes de crachats; l'un des orifices du bouchon laissait passer un tube de verre en rapport extérieurement avec une soufflerie; ce tube descendait intérieurement presque au contact des crachats,

mais, à 15 millimètres de son extrémité, il était coudé à 45 degrés; l'autre orifice donnait passage à un deuxième tube de verre qui s'ouvrait d'une part dans la partie supérieure du tube-flacon et, d'autre part, dans une caisse à inhalation de 86 ou de 126 litres contenant des cobayes. La soufflerie étant en marche l'air traversant le premier tube venait frapper les crachats avec force, les déprimait et sortait par le second tube pour se rendre dans la caisse à inhalation; si, dans ces conditions, des particules respirables étaient détachées, elles devaient être inhalées par les animaux d'expérience.

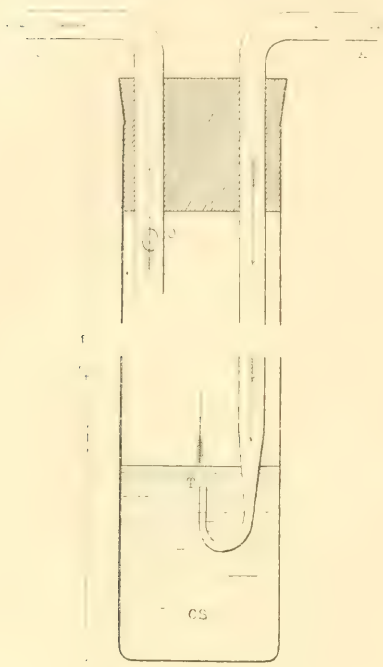


Fig. 2. — *Schéma du dispositif employé pour l'épreuve de la ventilation profonde.*

A, tube d'arrivée de l'air fourni par une soufflerie; CS, crachats ou salive bacillaires; T, petit tube de sortie de l'air dirigé de bas en haut; S, tube de sortie de l'air, se rendant dans la caisse à inhalation; O, orifice latéral du tube de sortie destiné à empêcher l'obstruction momentanée de ce tube par la projection de gouttes.

La ventilation profonde était réalisée à l'aide d'un tube-flacon semblable, mais le tube d'arrivée de l'air était recourbé en anse à son extrémité inférieure, de telle sorte que le jet d'air sortait de bas en haut; en faisant plonger cette anse dans la salive ou les crachats, ces liquides étaient fortement agités et pouvaient peut-être, dans ces conditions, libérer des gouttelettes respirables; l'air se rendant directement dans la caisse à inhalation il était possible de savoir, par l'autopsie ultérieure des cobayes, s'il y avait eu entraînement de particules bacillaires assez fines pour être respirées. L'appareil utilisé pour la ventilation profonde est celui que nous avons décrit sous le nom de pulvérisateur simple (8), mais avec un tube d'arrivée de l'air de diamètre généralement plus élevé.

Qu'il s'agisse de ventilation superficielle ou profonde, la vitesse de l'air à l'orifice a été calculée chaque fois d'après le débit de l'air et la section du tube en ce point.

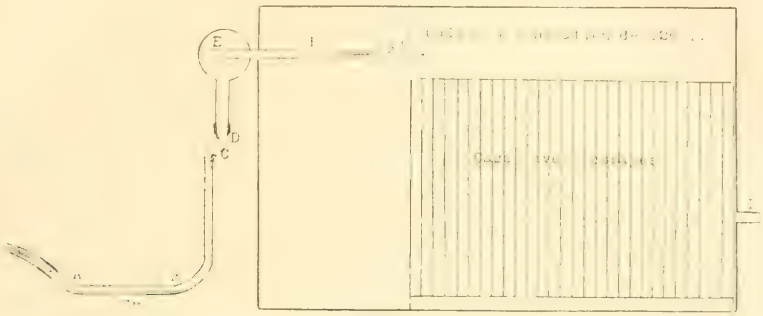


Fig. 3. — *Schéma du tube contenant le liquide bacillaire et adapté sur la caisse à inhalation.*

So, tube de caoutchouc venant de la soufflerie; CS, tube-flacon contenant les crachats ou la salive; F, direction du jet d'air ayant été en contact avec le liquide; T, tube de décompression de la caisse, obturé avec un tampon de coton très peu serré. (La figure représente la projection de tout l'appareil sur un plan horizontal.)

Pulvérisabilité de quelques liquides. — Un certain nombre d'essais réalisés avec divers liquides nous avaient déjà montré que la pulvérisabilité est en raison inverse de la viscosité.

La pulvérisabilité des solutions colorées dont nous nous sommes servi pour l'étude de la morphologie, du temps de suspension et de la respirabilité des particules (10) était à peu près égale à celle de l'eau. Celle des dilutions de crachats employées pour les infections par inhalation et l'étude du temps de suspension était sensiblement égale.

Le pulvérisateur de Richardson pouvait permettre quelques comparaisons. Pour les solutions colorées, le liquide d'ascite, le sérum, la vitesse minima de l'air exigée pour pulvériser avec l'appareil de Richardson était de 60 mètres par seconde; pour la salive mixte, cette vitesse minima était de 90 à 100 mètres; pour la glycérine, il fallait une vitesse minima de 150 mètres, et, même dans ces conditions, la division ne s'effectuait qu'en très petite quantité.

Mais, pour les liquides très visqueux, nous ne pouvions faire des essais comparatifs qu'avec le pulvérisateur simple. La

vitesse nécessaire pour pulvériser les liquides précédents, avec ce dernier appareil, est moins grande qu'avec le pulvérisateur de Richardson, mais elle est encore de 40 à 60 mètres. On s'assure qu'une fraction du liquide est pulvérisée en le colorant et en plaçant à la sortie du tube une feuille de papier ou une lame de verre chaude qui recueille les particules et permet de les examiner; on obtient ainsi des gouttelettes qui ont de 2 à 60 microns de diamètre.

On peut préparer avec la graine de lin un liquide mucilagineux ayant la consistance des crachats, et il est possible de le colorer. Si l'on fait des essais avec ce mucilage épais, on constate qu'il est très difficile d'en pulvériser une petite fraction, bien que le liquide mousse et crépite fortement. Avec une vitesse de 100 mètres au moins, on peut arriver à recueillir à la sortie quelques particules colorées de 2 à 5 microns de diamètre, et le débit est d'environ 1/100 à 1/50 de milligramme à la minute. Le mucilage que nous avons employé était d'une consistance un peu moindre que celle des crachats, et nous avons cru qu'il y avait en réalité division de quelques portions de liquide coloré imparfaitement incorporé à la masse.

Ces quelques essais nous montrent déjà que la viscosité constitue un obstacle à la pulvérisation; mais il faut expérimenter avec les crachats et la salive pour arriver à des conclusions intéressantes à l'égard de la contagion tuberculeuse.

Pulvérisabilité des crachats tuberculeux. — Les expériences I à III inclusivement sont faites par ventilation superficielle; les suivantes se rapportent à la ventilation profonde.

Exp. I. — Cette expérience est faite avec le dispositif indiqué plus haut. La section inférieure du tube d'arrivée de l'air est de $4^{mmq}40$; le débit d'air de 392 cent. cubes à la seconde, ce qui donne à l'orifice une vitesse d'environ 90 mètres par seconde. Le tube de sortie a une section à peu près triple; la vitesse de l'air s'y trouve donc être de 30 mètres environ; ce dernier tube pénètre dans notre caisse à inhalation de 86 litres dans laquelle se trouvent 8 cobayes. La caisse métallique est fermée par une gouttière contenant de l'eau; la décompression s'effectue par un tube latéral de 4 centimètres de diamètre, lequel est bouché par un tampon de coton très peu serré.

Nous mettons dans le tube-flacon 20 grammes de crachats muco-purulents, contenant 62.000 bacilles par milligramme, et nous y faisons passer 125 litres d'air en 5 minutes environ.

Les cobayes inhalent cet air pendant 3 h. 40; mais 3 de ces animaux

meurent d'asphyxie; les 5 survivants, sacrifiés après 37 jours, sont *parfaitement sains* et en bon état général.

Exp. II. — Effectuée avec le même appareil contenant des mucosités nummulaires, mélangées de salive, d'un second malade ; ces mucosités renferment 70.000 bacilles par milligrammes. Nous y faisons passer, dans les mêmes conditions, la même quantité d'air; durant l'expérience, nous nous apercevons que l'air pénètre dans le liquide muco-purulent, le fait mousser, et que des bulles éclatent.

7 cobayes subissent l'inhalation pendant 3 heures. Sacrifiés 35 jours plus tard, ces animaux sont *indemnes de tuberculose.*

Exp. III. — Nous employons la même méthode avec la caisse 126 à inhalation, et nous nous servons de 20 grammes de crachats d'un troisième malade; ces mucosités sont de même aspect nummulaire et contiennent 63.500 bacilles par milligramme. Nous y faisons passer 150 litres d'air en 6 minutes environ. L'appareil étant en marche, l'air déprime la surface du liquide bacillaire et pénètre jusqu'au fond du tube.

Les cobayes respirent cet air pendant 3 h. 30 minutes. Sacrifiés 37 jours plus tard, 6 *animaux sur les* 7 *sont parfaitement sains*; le 7e présente un *tubercule pulmonaire primitif* avec adénopathie caséeuse.

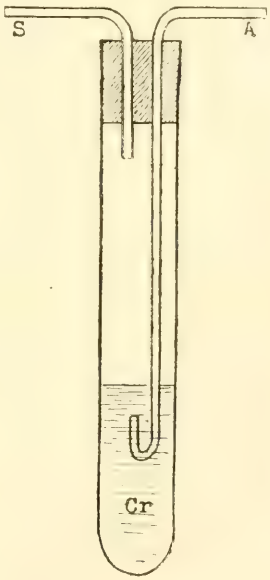


Fig. 4. — *Dispositif employé pour l'expérience IV.*

A, tube d'arrivée de l'air; S, tube de sortie de cet air; Cr, crachats tuberculeux.

Exp. IV. — Cette expérience et les suivantes sont effectuées par ventilation profonde.

Dans un tube large de 18 millimètres, haut de 18 centimètres, nous avons mis 17 grammes de crachats frais, muco-purulents, contenant 90.000 bacilles par milligramme, provenant d'un quatrième malade. Ce tube étant adopté sur la caisse de 126 litres contenant 10 cobayes, nous avons fait traverser ces crachats par 200 litres d'air. Le diamètre du tube plongeant dans les mucosités était tel que la vitesse de l'air à la sortie de ce tube fut de 15m60 à la seconde; pendant l'expérience, le liquide était fortement agité; de temps à autre, un fragment atteignait le tube de sortie et était entraîné dans la caisse à inhalation.

Les 200 litres d'air furent introduits par fractions de 50 litres, d'heure en heure, et les cobayes inhalèrent pendant 5 h. 40 minutes.

Tués 36 jours après l'expérience, tous ces animaux étaient en excellente santé et ne présentaient *aucune trace de tuberculose.*

Exp. V. — Dans un tube-flacon de 35 millimètres de largeur sur 40 centimètres de hauteur, nous mettons 70 grammes de crachats muco-purulents

d'un autre malade ; ces mucosités contenaient 73.000 bacilles par milligramme ; le tube fut adapté sur la caisse 126. La vitesse de l'air, à l'orifice du tube d'arrivée, était de 20 mètres par seconde, et le débit était de 11 à 12 litres à la minute ; nous fîmes passer en une seule fois 104 litres d'air. 6 cobayes inhalèrent pendant 2 heures ; sacrifiés 35 jours plus tard, *ils étaient sains*.

Pendant cette expérience et les suivantes, nous avons constaté que les crachats étaient fortement agités et qu'ils étaient transformés en quelques minutes en une sorte de purée homogène.

Exp. VI. — Identique à la précédente, elle est faite avec les mêmes crachats déjà homogénéisés. Il passe dans l'appareil 112 litres d'air que 6 cobayes inhalent pendant 2 heures ; ces animaux sont tués 35 jours plus tard et *reconnus sains*.

Exp. VII. — Exécutée avec le même produit pathologique, et le même appareil, mais en portant la vitesse de l'air à 35 mètres par seconde. Nous faisons passer 100 litres d'air que les 6 cobayes utilisés inhalent pendant 2 heures ; sacrifiés 35 jours plus tard, *ces animaux ne sont pas tuberculeux*.

Exp. VIII. — Identique à la précédente et exécutée avec le même produit depuis longtemps complètement homogénéisé. 100 litres d'air barbotent d'un seul trait dans ce liquide ; 6 animaux inhalent pendant 2 heures ; sacrifiés 35 jours plus tard, 5 sont indemnes ; le sixième présente un *tubercule pulmonaire primitif*.

Exp. IX. — Réalisée avec un tube-flacon de $27^{mm}5$ de diamètre sur 37 centimètres de hauteur. Il y a dans le flacon 45 grammes de mucosités d'un autre malade ; la vitesse calculée de l'air est de $36^{m}50$ par seconde ; les crachats contiennent 64.000 bacilles par milligramme ; dans la caisse à inhalation de 126 litres se trouvent 8 cobayes ; nous faisons passer 120 litres d'air que les animaux inhalent pendant 4 heures. Sacrifiés 37 jours plus tard, 7 *cobayes sont sains* ; le huitième présente un *tubercule pulmonaire* avec adénopathie caséeuse correspondante.

Exp. X. — Même dispositif et même vitesse de l'air, avec les crachats d'un autre malade. Il y a dans le flacon 40 grammes de mucosités légèrement purulentes, contenant 70.000 bacilles par milligramme. Nous faisons passer 130 litres d'air ; 8 cobayes restent soumis à l'inhalation pendant 3 h. 15 minutes : sacrifiés après 35 jours, ils sont *parfaitement sains*.

Exp. XI. — Mêmes conditions expérimentales avec 60 grammes de crachats d'un autre malade ; ces expectorations sont très peu purulentes, surtout muqueuses, et un peu aérées ; elles contiennent 62.000 bacilles par milligramme ; nous y faisons passer 120 litres d'air. Les cobayes, au nombre de 7, inhalent pendant 3 heures ; sacrifiés 37 jours après, ils sont tous en très bon état et *indemnes de tuberculose*.

Exp. XII. — Même dispositif expérimental avec un tube d'arrivée de l'air de diamètre plus faible, pour augmenter la vitesse ; 30 grammes de crachats purulents et nummulaires, contenant 120.000 bacilles par milligramme ;

10 cobayes dans la caisse à inhalation de 126 litres; vitesse de l'air: 64 mètres par seconde. Les crachats sont fortement agités par le courant d'air et des bulbes éclatent; quelques gouttes sont projetées jusqu'en haut du tube. Nous faisons passer en deux fois 400 *litres d'air*, que les cobayes inhalent pendant 7 heures. Ces animaux sont sacrifiés 34 à 37 jours après; 7 *sont indemnes*; 3 *ont chacun un tubercule pulmonaire primitif* avec adénopathie caséeuse et lésions de généralisation au début.

Exp. XIII. — Même dispositif. Vitesse réalisée par le courant d'air: 85 mètres par seconde; 75 grammes de crachats muco-purulents contenant 23.000 bacilles par milligramme. Nous faisons passer 264 litres d'air; les cobayes, placés dans la même caisse, sont soumis à l'inhalation pendant 5 heures. Sacrifiés 50 jours plus tard, 5 *animaux sont indemnes*; 3 *sont tuberculeux* avec une lésion pulmonaire primitive chacun.

Exp. XIV. — Même manière de procéder. Vitesse du courant d'air: 242 mètres par seconde; 35 grammes de crachats muco-purulents contenant 92.000 bacilles par milligramme. Nous faisons passer une première fois 165 litres d'air que les animaux inhalent pendant 5 h. 30 minutes. 8 jours plus tard, avec 50 grammes de crachats du même malade, et le même appareil, la séance d'inhalation est répétée; cette fois, 200 litres d'air traversent les crachats, et les animaux inhalent pendant 6 heures.

Sacrifiés 36 et 37 jours après la première séance d'inhalation, *tous ces animaux, au nombre de* 10, *sont tuberculeux*; ils présentent chacun de nombreuses lésions primitives.

Pulvérisabilité de la salive. — Pour procéder à des recherches sur les conditions de pulvérisabilité de la salive, nous avons recueilli le liquide buccal de 8 tuberculeux cavitaires; chez tous ces malades, l'examen microscopique avait montré de nombreux bacilles; les teneurs des crachats variaient entre 30.000 et 100.000 bacilles par milligramme. Pour obtenir cette salive, nous fîmes remettre à chacun de ces malades un verre, en le priant d'y déposer de la salive et non des crachats; malgré les précautions prises, nous vîmes qu'il y avait dans la plupart des récipients, avec le produit buccal, une quantité variable de muco-pus bronchique.

La salive mixte ainsi recueillie était trouble, grise, épaisse chez tous les sujets, très filante, quelquefois mélangée en outre de débris alimentaires; nous en avions en tout 60 cent. cubes. Il s'agissait là du produit tel qu'il est émis dans les conditions naturelles, et ce liquide mélangé était convenable pour le but que nous nous proposions.

Un examen microscopique pratiqué sur une petite quantité du mélange nous montra qu'il contenait des bacilles.

De même que pour les crachats tuberculeux, nous avons procédé à deux sortes d'épreuves : la ventilation superficielle et la ventilation profonde.

Exp. XV. — Les deux premières expériences se rapportent à la ventilation superficielle ; le dispositif est semblable à celui utilisé par les crachats ; la salive est déposée dans un tube-flacon de 35 millimètres de diamètre sur 45 centimètres de hauteur ; le tube d'arrivée de l'air fait un angle de 45 degrés avec la surface du liquide ; l'appareil est adapté sur la caisse 126 à inhalation, où se trouvent 6 cobayes. Quand on fait marcher la soufflerie, l'air arrive sur le liquide à une vitesse de 50 mètres par seconde, déprime ce liquide et y pénètre en formant des bulles qui éclatent. En 7 minutes, nous faisons passer 100 litres d'air ; à la fin, le liquide, qui contenait quelques fragments de crachats, est homogénéisé ; son agitation a été beaucoup plus forte que dans la bouche.

Les cobayes inhalent cet air pendant 1 h. 30 minutes. Ils sont sacrifiés 35 jours plus tard et *reconnus sains.*

Exp. XVI. — Même matériel et même produit salivaire. La partie inférieure du tube d'arrivée de l'air est simplement changée pour augmenter la vitesse. 6 cobayes sont dans la caisse de 86 litres sur laquelle le tube-flacon est adapté. Nous faisons passer 100 litres d'air à la vitesse de 80 mètres par seconde, et les animaux inhalent pendant 1 h. 30 minutes ; sacrifiés 36 jours plus tard *tous sont parfaitement sains.*

Exp. XVII. — Dans cette expérience et les suivantes, nous avons opéré par ventilation profonde, c'est-à-dire par barbotage de l'air dans le même tube de salive ; ce tube contenait un liquide complètement homogénéisé par les deux premières épreuves, et de viscosité diminuée ; les conditions devenaient donc de plus en plus favorables au détachement de particules liquides.

Nous faisons passer 100 litres d'air à une vitesse de 20 mètres par seconde ; 8 cobayes inhalent pendant 1 h. 45 minutes ; sacrifiés 36 jours plus tard, *aucun de ces animaux n'est atteint de tuberculose.*

Exp. XVIII. — Après changement du tube d'arrivée de l'air, de manière à réaliser une vitesse de 35 mètres par seconde, le même tube-flacon est adapté sur la caisse 126, dans laquelle se trouvent 7 cobayes ; 100 litres d'air traversent le liquide et les animaux inhalent pendant 1 heure 45 minutes ; morts ou sacrifiés après 23, 23, 30, 36, 36, 36 et 36 jours, *aucun d'eux n'est atteint de tuberculose.*

Exp. XIX. — Nouveau changement du tube d'arrivée de l'air, de telle sorte que la vitesse à l'orifice est portée à 55 mètres par seconde ; l'appareil est adapté sur la même caisse désinfectée. 100 litres d'air traversent le liquide, et l'on remarque que ce liquide est projeté en gouttes jusqu'en haut du flacon pendant la marche de l'expérience. 7 cobayes inhalent pendant 1 heure 45 minutes ; morts ou sacrifiés de 27 à 35 jours après, 2 *de ces animaux sont tuberculeux* avec chacun une lésion pulmonaire primitive et des tubercules récents dus à la généralisation.

Exp. XX. — Même façon d'opérer avec la caisse de 86 litres ; la vitesse est portée à 80 mètres par seconde et nous faisons barboter 100 litres d'air en présence de 6 cobayes ; pendant cette opération, le liquide est projeté en gouttes jusqu'en haut du tube. Les 6 cobayes inhalent pendant 1 heure 35 minutes ; sacrifiés après 41 jours, *ils sont reconnus sains.*

Exp. XXI. — Même produit salivaire avec la caisse de 126 litres ; la vitesse réalisée est de 150 mètres par seconde ; 6 cobayes sont dans la caisse. Nous faisons traverser la salive par 100 litres d'air ; l'appareil fonctionne en crépitant et il projette un grand nombre de gouttelettes qui amènent une baisse de niveau du liquide ; la pulvérisation cesse alors pendant un instant très court, jusqu'à ce que la chute des particules ait rétabli le niveau minimum nécessaire ; le tube pulvérisant est ainsi dans les meilleures conditions pour faire la division fine.

Les 6 cobayes inhalent pendant 1 heure 35 minutes ; sacrifiés 41 jours plus tard, 3 *animaux sur les* 6 *sont tuberculeux* et présentent chacun 1, 1 et 2 tubercules primitifs avec des lésions récentes de généralisation.

Exp. XXII. — Cette dernière expérience est faite pour s'assurer de la nocivité du liquide qui a servi pour les sept épreuves précédentes. Après ces divers essais, la salive est uniformément trouble ; c'est un mélange intime de crachats et de salive mixte. L'examen microscopique pratiqué une autre fois y montre quelques bacilles ; le nombre en est estimé approximativement à 600 par milligramme.

Pour savoir jusqu'à quel point la pulvérisation de ce liquide est dangereuse, nous en prélevons une goutte pesant 60 milligrammes et cette goutte est additionnée d'eau de façon à faire 1 cent. cube ; ce produit est pulvérisé dans la caisse 86, avec un petit pulvérisateur angulaire, en présence de 5 cobayes ; la pulvérisation demande à peine 30 secondes.

Sacrifiés 30 jours plus tard, les 5 animaux présentent *en moyenne* 9 *tubercules pulmonaires primitifs* chacun, ainsi que des lésions de généralisation récente.

Le produit soumis aux épreuves de ventilation superficielle ou profonde était donc assez fortement bacillaire.

Résumé et conclusions.

Le tableau récapitulatif ci-après permet de revoir rapidement le résultat de toutes les épreuves.

1° *Avec les crachats.* — La ventilation superficielle, avec une vitesse de 90 mètres par seconde, sous un angle de 45 degrés, ne détache en général aucune particule bactérienne ; sur 3 expériences ainsi faites, 2 ont été complètement négatives, et la troisième, comprenant 7 cobayes, a réalisé l'infection d'un seul sujet avec un tubercule primitif, pour 125 litres d'air ayant passé dans les mucosités virulentes.

TABLEAU RÉCAPITULATIF

EXPÉRIENCES n°	MALADE n°	VITESSE de l'air par seconde, en mètres.	QUANTITÉ d'air ayant passé dans l'appareil.	NOMBRE de cobayes survivants ayant inhalé cet air.	NOMBRE DE COBAYES	
					Sains.	Tuberculeux.
I. — Crachats : *Ventilation superficielle.*						
1	1	90 m. »	125 litres.	7	7	0
2	2	90 m. »	125 —	5	5	0
3	3	90 m. »	150 —	7	6	1
II. — Crachats : *Ventilation profonde.*						
4	1	15 m. 60	200 litres	10	10	0
5	2	20 m. »	104 —	6	6	0
6	3	20 m. »	112 —	6	6	0
7	4	35 m. »	100 —	6	6	0
8	5	35 m. »	100 —	6	5	1
9	6	36 m. 50	120 —	7	7	0
10	7	36 m. 50	130 —	8	8	0
11	8	36 m. 50	120 —	8	7	1
12	9	64 m. »	400 —	10	7	3
13	10	85 m. »	264 —	8	5	3
14	11	242 m. »	365 —	10	0	10
III. — Salive : *Ventilation superficielle.*						
15	1	50 m. »	100 litres.	6	6	0
16	2	80 m. »	100 —	6	6	0
IV. — Salive : *Ventilation profonde.*						
17	1	20 m. »	100 litres.	8	8	0
18	2	35 m. »	100 —	7	7	0
19	3	55 m. »	100 —	7	5	2
20	4	80 m. »	100 —	6	6	0
21	5	150 m. »	100 —	6	3	3
				150	126	24

Remarque. — A part les cobayes de la série 14. qui ont été tuberculisés à un haut degré, tous les sujets tuberculeux présentaient l'infection minima, c'est-à-dire un seul tubercule pulmonaire primitif.

Sur cinq expériences, avec les vitesses de 15, 20 et 35 mètres, le barbotage, ou ventilation profonde, nous a donné un seul résultat positif pour 34 cobayes et 616 litres d'air. De trois autres expériences faites avec une vitesse de 36^{m}50, deux ont été complètement négatives ; la troisième, comprenant 7 cobayes, a donné un tuberculeux, avec un tubercule primitif, pour 120 litres d'air ayant traversé les expectorations bacillaires.

Avec les vitesses de 64 et de 85 mètres par seconde, nous avons eu 6 cobayes infectés, chacun avec un tubercule pulmonaire, sur 18 animaux soumis à l'inhalation, pour 400 et 264 litres d'air !

Enfin, en employant des courants d'air de vitesse encore plus considérable, il se détache suffisamment de particules pour tuberculiser tous les cobayes.

En résumé, *pour des vitesses inférieures à 35 mètres par seconde, le crachat tuberculeux est très difficilement pulvérisable ; il ne laisse détacher en général aucune particule susceptible d'être inhalée.*

Il convient d'insister sur ce point que les conditions de nos expériences ont été particulièrement sévères. Ces conclusions s'appliquent *a fortiori* au muco-pus bronchique, dont la consistance est un peu plus grande que celle des crachats, ces derniers étant mélangés de salive.

2° *Avec la salive.* — Deux expériences de ventilation superficielle, aux vitesses de 50 et 80 mètres par seconde, ont donné des résultats négatifs. 3 expériences de ventilation profonde, avec les vitesses de 20, 35 et 80 mètres par seconde, n'ont également infecté aucun animal ; une expérience à la vitesse de 55 mètres a réalisé l'infection de 2 animaux sur 7 ; et une expérience à la vitesse de 150 mètres a donné 3 tuberculeux sur 9.

Nous devons donc déduire de ces recherches que *la salive, même dans les conditions sévères où nous nous sommes placés, est très difficilement pulvérisable*, et que les vitesses courantes de 10 à 30 mètres par seconde ne détachent pas de particules bacillaires fines quand on procède par barbotage. La ventilation superficielle est sans effet avec une vitesse supérieure à 50 mètres par seconde. Nous avons d'autre part noté que, malgré la production de nombreuses gouttelettes dans le tube-flacon, l'infection est rarement réalisée avec les vitesses employées ; par conséquent, la plupart de ces gouttelettes sont trop volumineuses pour être transportées puis inhalées, et celles qui sont fines ne contiennent généralement pas de bacilles, car notre dernière expérience de contrôle démontre l'infectiosité de ce même liquide quand il est pulvérisé finement.

Ces résultats ne suffisent pas, assurément, à la réfutation de l'hypothèse de Flügge ; ils nous montrent seulement que les

mucosités bronchiques et la salive sont beaucoup plus difficilement pulvérisables que ne le supposèrent cet auteur et ses élèves. Il est sans doute possible, avec les courants d'air les plus faibles que nous ayons utilisés, de détacher de ces liquides des particules grossières qui iraient polluer un liquide stérile placé à proximité; mais on en détachera avec beaucoup de peine des particules assez fines pour être respirables, et c'est ce qui nous importe le plus.

Pour émettre une opinion définitive, en ce qui concerne la contagion interhumaine par inhalation de gouttelettes, il est indispensable de procéder à d'autres investigations.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

(1) P. Chaussé. — La contagion de la tuberculose par les particules liquides (histoire et critique de la théorie de Flügge). *Revue d'hygiène*, 20 juin 1913.

(2) Flügge. — Ueber Luftinfektion. *Zeitschrift für Hygiene*, vol. XXV, p. 179, 1897.

(3) Flügge. — Ueber die nächsten Aufgaben zur Erforschung der Verbreitungsweise der Phtisie. *Deutsche medizinische Wochenschrift*, 14 octobre 1897, p. 665.

(4) Laschtschenko. — Ueber Luftinfektion durch beim Husten, Niesen und Sprechen verspritzte Tröpfchen. *Zeitschrift für Hygiene*, 1899, vol. XXX, p. 125.

(5) P. Chaussé. — Sur la teneur des produits pathologiques en bacilles tuberculeux. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 16 avril 1910.

(6) P. Chaussé. — Transmissibilité de la tuberculose par brossage de vêtements souillés. *Comptes rendus de l'Acad. de Médecine*, 13 mai 1913 ; *Revue d'hygiène*, 20 mai 1913. — Transmissibilité de la tuberculose par agitation de linges souillés. *Comptes rendus de l'Acad. de Médecine*, 22 juillet 1913 ; *Revue d'hygiène*, 20 septembre 1913.

(7) Weissmayr. — Zur Frage der Verbreitung der Tuberkulose. *Wiener klin. Wochenschrift*, 1898, n° 46.

(8) P. Chaussé. — Méthodes à employer pour réaliser la tuberculose expérimentale par inhalation. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 13 mai 1913 ; *Bull. de la Soc. centrale de médecine vétérinaire*, 30 juillet 1913.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR LES RÉACTIONS ANAPHYLACTIQUES PRODUITES PAR LES ALBUMINOÏDES DU CRISTALLIN

par V. MORAX et J. BOLLACK.

Au cours de ces dernières années, on a été amené à attribuer aux matières albuminoïdes du cristallin des propriétés spéciales les différenciant des autres albuminoïdes de l'organisme. Les recherches d'Uhlenhuth sur les sérums précipitants attirèrent l'attention sur les faits suivants : d'une part, en injectant à des lapins du cristallin d'une espèce donnée, on obtient un sérum qui précipite *in vitro*, non seulement les extraits cristalliniens de l'espèce correspondante, mais encore ceux d'autres mammifères, d'oiseaux, d'amphibies ; le cristallin est, d'autre part, le seul organe qui ne donne pas de précipité avec un antisérum préparé avec le sang de l'animal correspondant.

Les albuminoïdes du cristallin semblent donc, dans leurs réactions précipitantes, différer des albuminoïdes du sérum et des autres organes : tandis que ces substances jouissent de propriétés précipitantes spécifiques de l'espèce, le cristallin semble être doué d'une véritable spécificité d'organe.

Ces faits furent confirmés par Rœmer, qui décelait les anticorps cristalliniens en utilisant la méthode de la déviation du complément, puis par P. Andrejew à l'aide des réactions anaphylactiques. Après avoir sensibilisé des cobayes par une injection de cristallin d'une espèce étrangère donnée, il provoquait assez régulièrement des symptômes d'anaphylaxie par l'injection déchaînante de cristallin de la même espèce, plus rarement par l'injection de cristallin d'espèces différentes. Les animaux sensibilisés par le cristallin n'étaient, d'autre part, pas anaphylactisés à l'égard du sérum ou d'extraits d'organes des espèces qui avaient fourni le cristallin. Enfin Andrejew montra la sensibilité du cobaye à l'égard de son propre cristallin, lors-

qu'il a été soumis à des injections préparantes de cristallin d'espèces différentes.

Andrejew prouva donc qu'il n'est pas plus possible par les réactions anaphylactiques que par la réaction de précipitation de différencier l'albumine cristallinienne des différentes espèces.

Expérimentant sur le cobaye par la voie intra-oculaire, Krusius admit que l'on peut sensibiliser cet animal par et pour le cristallin de son espèce et même par la résorption de son propre cristallin obtenue par une simple discision de sa capsule. Il montra, en outre, que l'on peut, en partant de l'œil, obtenir une hypersensibilité de tout l'organisme à une substance.

Römer et Gebb contrôlent ces expériences en les reprenant avec plus de rigueur et concluent dans un sens opposé : pour ces expérimentateurs il n'est pas possible de sensibiliser le cobaye par son propre cristallin.

Kapsenberg montre que le cobaye, dans certaines conditions particulières, présente une sensibilité relative à son propre cristallin.

Il semble donc difficile de tirer une conclusion de ces résultats souvent contradictoires : c'est ce qui nous a engagés à reprendre ces expériences en en perfectionnant la technique.

Il importe en effet, lorsqu'on expérimente sur le cobaye, animal de choix pour l'étude des réactions générales de l'anaphylaxie, de ne pas gêner l'observation des phénomènes caractéristiques, par l'adjonction de troubles dus soit à la toxicité propre où à l'action mécanique de la substance injectée, soit au mode d'introduction de celle-ci. L'on conçoit, par exemple, que l'injection déchaînante pratiquée dans le péritoine, dans le cerveau, ou dans le cœur, puisse, sinon tuer le cobaye, du moins déterminer chez lui des troubles graves, des variations thermiques qu'il ne faudrait pas confondre avec les troubles dus à l'anaphylaxie.

Il nous a semblé, d'autre part, que l'on affirmait trop facilement la réalité de l'anaphylaxie en présence de phénomènes légers, sujets à des erreurs d'interprétation tels que le prurit, l'agitation; ces symptômes n'ont de valeur que s'ils sont associés et l'on ne peut rien conclure de leur existence isolée.

Nous nous sommes donc entourés pour nos expériences, tant dans la préparation des substances à étudier que dans leur

mode d'injection et dans l'observation de phénomènes anaphylactiques, de toute la précision possible. Voici, d'ailleurs, la technique que nous avons suivie :

Animal employé. — Le cobaye nous a paru être l'animal de choix pour l'étude de l'anaphylaxie générale. Les symptômes en sont chez lui beaucoup plus nets que chez le lapin et l'utilité de répéter les expériences en série le rend plus maniable que le chien.

Préparation de la substance cristallinienne. — Les cristallins des divers animaux, cheval, bœuf, mouton, cobaye, sont extraits aseptiquement peu de temps après la mort, après lavage de la conjonctive et cautérisation de la cornée ; ils sont séparés de leur capsule et injectés au cobaye à l'état frais ou à l'état sec.

Dans le premier cas, nous avons essayé d'injecter le cristallin entier sous la peau, mais, ayant observé des nécroses cutanées au niveau du point d'insertion, nous avons préféré le broyer et le délayer dans des proportions convenables d'eau physiologique stérilisée.

Dans le second cas, les cristallins sont desséchés dans le vide sulfurique pendant plusieurs jours, puis broyés au mortier : on obtient ainsi une poudre fine, blanche ou légèrement jaunâtre, pouvant se conserver presque indéfiniment à l'abri de l'air et qu'il est facile d'émulsionner dans la quantité voulue d'eau physiologique, quelques heures avant l'injection. Comme nous avons observé des accidents emboliques à la suite de l'injection intraveineuse immédiate de cette émulsion, nous avons préféré l'agiter auparavant pendant plusieurs heures, puis la laisser au repos à la glacière. Il se forme un léger dépôt; le liquide surnageant opalescent contient des quantités comparables d'albumine cristallinienne et servira à l'injection.

Injection préparante. — La quantité de cristallin injecté au cobaye a varié, suivant les expériences, de 0 gr. 01 à 3 grammes (cristallin frais dans ce dernier cas), en moyenne 0 gr. 025.

L'injection préparante se fait soit sous la *peau*, mais expose alors parfois chez le cobaye à la production d'abcès ou d'eschares très graves, parfois mortelles, soit plus simplement dans le *péritoine*, et n'est alors en général suivie d'aucun trouble. Il est inutile d'employer une voie d'absorption plus rapide. Cette différence dans la voie d'introduction de la première injection ne nous a paru influencer en rien l'intensité du choc anaphylactique ultérieur.

Nous n'avons pas employé la voie *intra-oculaire* dans cette série d'expériences, car elle est difficilement praticable chez le cobaye, et les résultats fournis par Krusius, Kümmel, et par quelques expériences personnelles, ne nous ont pas paru démontrer clairement la réalité de la sensibilisation générale, obtenue par voie oculaire. (C'est ainsi que 3 lapins préparés par l'injection, dans la chambre antérieure ou la cornée, de sérum ou d'extrait cristallinien d'une espèce étrangère, ne se sont montrés aucunement sensibilisés à l'injection intraveineuse ultérieure de ces mêmes substances : nous n'avons observé aucun symptôme ni général, ni local.)

Injection déchaînante. — Elle est pratiquée en moyenne trois à quatre semaines après l'injection préparante. La substance injectée, lorsqu'il s'agit du cristallin, est la même que celle de la première injection.

La quantité de cristallin frais ou sec employée a varié, suivant les expériences, de 0 gr. 02 à 0 gr. 20 pour 1 cent. cube d'émulsion.

Pour un même animal, elle est plus forte que la dose employée lors de l'injection préparante.

Comme voie d'introduction, nous avons adopté la *veine* de la patte postérieure du cobaye. Celle-ci, visible superficiellement à la face postérieure de la cuisse de l'animal après légère compression de la racine du membre, se prête parfaitement à l'injection : il suffit d'inciser légèrement la peau qui la recouvre et de pénétrer dans le vaisseau avec une aiguille très fine. C'est là le mode d'injection le plus régulier, le plus simple et le moins traumatisant que nous ayons observé.

Une série d'expériences préliminaires nous a montré que cette méthode d'injection est équivalente à l'injection dans la carotide ou la jugulaire pour la production du choc anaphylactique. Nous avons rejeté, après essai, les injections intracardiaques et intracérébrales comme traumatisant trop le cobaye; les injections sous-cutanées, sous-conjonctivales, intrarectales et intrapéritonéales comme donnant des résultats inconstants par suite de la durée variable de l'absorption.

Pour une même dose de substance injectée, la voie veineuse nous a toujours paru donner la réaction la plus nette : c'est ainsi que, chez le cobaye anaphylactisé par le sérum de cheval, l'injection déchaînante de 0 cent. cube 5 de sérum est toujours mortelle, dans la veine, alors qu'elle ne détermine que des troubles passagers et de l'hypothermie, si elle est pratiquée sous la peau, dans le rectum, dans le péritoine et même dans le cerveau.

Il nous faut faire une mention spéciale pour l'injection *intra-orbitaire*, qui nous a toujours donné des réactions très intenses et constantes : après anesthésie cocaïnique de la conjonctive, on pénètre avec une très fine aiguille au niveau de la paroi interne de l'orbite et l'on pousse l'injection en arrière du globe ; la richesse vasculaire de l'orbite et la proximité du sinus caverneux font de cette voie l'équivalente de la voie intraveineuse.

Nous avons enfin recherché s'il était possible de déchaîner le choc anaphylactique par l'injection *intra-oculaire*. L'injection pratiquée dans la chambre antérieure ou le vitré ne nous a pas permis d'observer chez le cobaye d'autres manifestations générales que de l'hypothermie variant de 0°5 à 1°5. Ce fait tient sans doute à la quantité relativement faible de liquide que l'on parvient à injecter.

Nous avons également recherché si l'injection déchaînante intra-oculaire pouvait, chez le lapin préparé, provoquer une *réaction locale* particulière : 4 lapins furent dans ce but préparés par une injection soit intraveineuse, soit intrapéritonéale, de 0 gr. 20 de cristallin de cheval. Huit semaines plus tard, on leur injecta dans la chambre antérieure après évacuation de l'humeur aqueuse, 0 gr. 005 de la même substance. La même opération fut pratiquée sur 4 lapins témoins neufs. On observa chez tous ces animaux une réaction locale assez intense qui disparut en huit jours et qui ne montra aucune différence appréciable chez les animaux traités et chez les témoins.

Symptômes anaphylactiques observés. — Afin de diminuer les causes d'erreur dues à une interprétation trop personnelle des phénomènes observés à la suite de l'injection intraveineuse déchaînante, nous n'avons cru devoir conclure à la réalité de l'anaphylaxie que lorsque les symptômes se groupaient sous deux formes :

Une forme grave, suraiguë, véritable choc anaphylactique, se caractérisant par des troubles nerveux (prurit, raideur de la nuque, secousses cloniques, attaques convulsives) et cardio-respiratoires (soif d'air, dyspnée intense). Elle aboutit à la mort en quatre à cinq minutes ;

Une forme moyenne, consistant en hérissement du poil, prurit, agitation, puis épuisement, dyspnée, émission des urines. Tous ces troubles apparaissent peu de temps après l'injection et s'atténuent après un temps variable, mais assez court. Il s'accompagnent d'un symptôme important, l'hypothermie. Nous l'avons recherchée méthodiquement et à plusieurs reprises après chaque injection. Elle apparaît en moyenne quinze minutes après l'injection, atteint un maximum après environ une heure et disparaît en une heure et demie à deux heures; elle varie de 1 à 5 degrés; son intensité et son évolution nous ont paru le plus souvent parallèles à celles de la réaction anaphylactique.

Nous n'avons donc conclu à l'anaphylaxie positive qu'en présence d'une de ces deux formes du syndrome anaphylactique.

Nous avons de plus multiplié les témoins dans chaque série d'expériences, nous servant soit de cobayes neufs, soit de cobayes préparés par des substances différentes.

Nous avons eu enfin la preuve rigoureuse de la réalité des symptômes observés en parvenant à *anti-anaphylactiser* certains animaux : c'est ainsi que, par la méthode des doses fractionnées et successivement croissantes (Besredka) pratiquées à des intervalles d'une demi-heure, nous avons pu injecter à 3 cobayes préparés par 1 centigramme de cristallin de bœuf des doses de 10 centigrammes de cette substance, sans provoquer aucun trouble, alors que 8 autres cobayes préparés de la même façon mouraient avec choc anaphylactique typique par l'injection de doses cinq et dix fois moindres.

Voici maintenant les résultats de nos expériences.

Première série d'expériences. — Elle eut pour but de répondre à la question suivante : un animal préparé par une injection de substances albuminoïdes cristalliniennes provenant d'une espèce étrangère donnée présente-t-il toujours des phé-

nomènes anaphylactiques lors de l'injection déchaînante de *ces mêmes substances*?

Un premier lot de cobayes fut soumis à une injection sous-cutanée ou intrapéritonéale de cristallin de *cheval* frais : la dose employée variait de 0 gr. 25 centigrammes à 3 grammes. D'autres cobayes furent préparés par injection intrapéritonéale ou sous-cutanée d'une quantité de cristallin de cheval desséché variant de 0 gr. 025 à 0 gr. 20 centigrammes.

Après trois à quatre semaines, les survivants furent traités par une injection intraveineuse d'émulsion contenant 0 gr. 02 à 0 gr. 10 centigrammes de cristallin sec de *cheval*.

Sur 17 cobayes observés, 8 présentèrent des accidents d'anaphylaxie grave avec mort en quelques minutes ; 5 réagirent d'une façon moins intense mais montrèrent des troubles nets avec hypothermie constante ; 4, enfin, ne furent aucunement malades. 3 témoins neufs supportèrent l'injection intraveineuse sans trouble apparent.

Il résulte de cette première catégorie d'expériences que, sur 17 cobayes traités par le cristallin de *cheval*, 13 cas d'anaphylaxie positive furent obtenus par l'injection déchaînante de la même substance.

Nous reprîmes les mêmes expériences en nous servant du cristallin de *bœuf* desséché (0 gr. 01 à 3 grammes en injection sous-cutanée ou intrapéritonéale préparante ; 0 gr. 005 à 0 gr. 20 centigrammes en injection intraveineuse déchaînante). Les accidents anaphylactiques furent ici encore plus nets que précédemment, puisque, sur 9 cobayes soumis à l'injection déchaînante, 7 présentèrent le choc avec mort en trois à quatre minutes, 1 fut très malade et montra une chute thermique de 4 degrés, 1 seul enfin ne réagit pas.

8 animaux sur 9 traités par le cristallin de *bœuf* eurent donc une réaction anaphylactique positive. 4 témoins neufs et 3 témoins traités par la méthode antia-naphylactique furent absolument indemnes.

Nous étudiâmes enfin les mêmes phénomènes en utilisant le cristallin de *mouton* desséché (injection préparante de 0 gr. 025 à 1 gramme; injection déchaînante de 0 gr. 025 à 0 gr. 075).

L'expérience a porté sur 12 cobayes : 5 moururent en trois à quatre minutes avec les signes typiques du choc anaphylactique, 4 présentèrent une réaction nette avec hypothermie de 2 à 3 degrés, 3 ne ressentirent aucun trouble apparent. La même injection pratiquée sur 3 cobayes témoins neufs ne fut suivie d'aucun symptôme morbide.

Sur 12 cobayes traités par le cristallin de *mouton*, 9 présentèrent donc une réaction anaphylactique positive.

De l'ensemble des résultats de cette première série d'expériences, on peut conclure, en totalisant les chiffres obtenus que, sur 38 cobayes traités par des injections préparantes de cristallins de cheval, de bœuf ou de mouton, l'injection déchaînante intraveineuse de la même substance a provoqué 30 fois une réaction anaphylactique positive, le plus souvent mortelle. L'anaphylaxie par les substances albuminoïdes du cristallin existe donc dans la très grande majorité des cas. Mais est-elle spécifique pour l'organe étudié, pour le cristallin? La deuxième série d'expériences répondra sur ce point.

Deuxième série d'expériences. — Un animal préparé par une injection de substances albuminoïdes cristalliniennes, provenant d'une espèce étrangère donnée, présente-t-il des troubles anaphylactiques à l'injection déchaînante du *sérum de cette même espèce*, ou inversement?

Pour étudier cette question nous avons d'abord recherché si les cobayes préparés par l'injection de *cristallin* réagissaient ensuite à l'injection de *sérum* de la même espèce. 2 cobayes furent ainsi soumis à l'injection extrapéritonéale de 2 grammes et de 0 gr. 025 de cristallin de *cheval*. L'injection déchaînante, trois semaines après, de 1 cent. cube de sérum de cheval ne fut suivie d'aucun trouble.

2 autres cobayes furent de même traités par une injection préparante de cristallin de *bœuf*. L'injection déchaînante de sérum de bœuf ne détermina aucun symptôme chez l'un ; l'autre présenta au contraire du malaise, et un peu d'hypothermie. Notons d'ailleurs ici qu'injectés en quantités égales les extraits bovins semblent être plus toxiques pour le cobaye que ceux du cheval.

3 cobayes, enfin, furent préparés par une injection intrapéritonéale de 0 gr. 025 ou 1 gramme de cristallin de *mouton*, puis soumis trois semaines plus tard à l'injection intraveineuse de 1 cent. cube de sérum de mouton. Deux des animaux furent absolument indemnes. L'un présenta un peu de dyspnée et une chute de la température de trois degrés.

Nous avons, d'autre part, soumis 6 cobayes à une injection préparante de 1 cent. cube de *sérum* de cheval, puis ultérieurement à une injection intraveineuse de *cristallin* de cheval (0 gr. 05 à 0 gr. 10). Aucun de ces animaux ne fut malade. Quatre témoins avaient été injectés : deux cobayes neufs injectés au cristallin de cheval et deux cobayes préparés par le sérum de cheval et injectés au cristallin de mouton : aucun ne présenta de troubles.

De cette deuxième série d'expériences on peut donc conclure, en résumant, que sur 7 cobayes injectés avec du cristallin d'une espèce étrangère donnée, puis ultérieurement avec le sérum de cette même espèce, 2 seulement présentèrent des

symptômes d'anaphylaxie moyenne. Sur 6 cobayes préparés inversement par du sérum, aucun ne réagit à l'injection déchaînante de cristallin de même espèce.

L'anaphylaxie sérique semble donc différer absolument de l'anaphylaxie cristallinienne ; en d'autres termes, il semble y avoir une véritable spécificité d'organe pour le cristallin. Mais cette spécificité d'organe est-elle limitée à l'espèce d'où provient le cristallin ou au contraire existe-t-elle vis-à-vis de cristallins d'espèces différentes ?

Troisième série d'expériences. — Elle eut donc pour but de rechercher si un animal préparé avec le cristallin d'une espèce étrangère donnée peut réagir à l'injection déchaînante de *cristallin d'une espèce différente.*

A un premier lot de 8 cobayes, nous injectâmes dans le péritoine du cristallin de cheval (0 gr. 025 à 2 grammes).

Trois semaines plus tard, 4 furent soumis à une injection intraveineuse de cristallin de bœuf (0 gr. 05) : 2 présentèrent des symptômes d'anaphylaxie, l'une mortelle en trois minutes, l'autre légère ; 2 autres furent absolument indemnes.

Les 4 autres cobayes de ce lot furent injectés, d'autre part, avec du cristallin de mouton (0 gr. 05) : l'un ne présenta aucun trouble, les 3 autres eurent des signes nets d'anaphylaxie, dont un cas mortel.

Un deuxième lot de 11 cobayes fut soumis à une injection intrapéritonéale de cristallin de bœuf (0 gr. 05). 7 d'entre eux furent plus tard injectés dans la veine avec du cristallin de cheval (0 gr. 02 à 0 gr. 05) : parmi ceux-ci, 3 furent indemnes, 2 moururent d'anaphylaxie grave en quelques minutes, et 2 présentèrent une réaction anaphylactique très nette.

Les 4 autres cobayes furent soumis à une injection intraveineuse de cristallin de mouton dans la veine : 3 d'entre eux moururent en trois à quatre minutes avec les symptômes de l'anaphylaxie suraiguë ; le quatrième ne réagit pas, mais l'injection avait été défectueuse chez lui.

Un troisième lot de 12 cobayes fut enfin traité par une injection préparante intrapéritonéale de cristallin de mouton (0 gr. 025 et 0 gr. 05 centigrammes). L'un fut trois semaines plus tard soumis à une injection intraveineuse de 0 gr. 05 de cristallin de bœuf : il mourut en trois minutes d'anaphylaxie grave. Les 11 autres furent, à des époques différemment éloignées de la première injection, traités par une seconde injection de cristallin de cheval : 4 d'entre eux ne montrèrent aucune réaction ; 5 présentèrent des symptômes moyens d'anaphylaxie avec hypothermie atteignant 5 degrés chez l'un et 3 degrés en moyenne chez les autres ; 2 enfin moururent en quelques minutes.

En examinant l'ensemble des résultats de cette troisième série d'expériences, on voit donc que : sur 8 cobayes préparés

par du cristallin de cheval et injectés secondairement avec du cristallin d'espèces différentes, 5 ont montré une anaphylaxie positive ; sur 11 cobayes préparés au cristallin de bœuf, puis soumis à l'injection de cristallins d'autres espèces, 7 ont réagi d'une façon positive ; sur 12 cobayes préparés au cristallin de mouton, 8 montrèrent une réaction anaphylactique positive à l'injection déchaînante de cristallins d'espèces différentes. Dans l'ensemble, sur 31 cobayes soumis à des injections préparantes et déchaînantes de cristallins d'espèces différentes, 20 ont eu une réaction anaphylactique positive. On en peut donc conclure que l'injection du cristallin d'une espèce donnée anaphylactise, en général, le cobaye pour le cristallin d'autres espèces. Ce fait est important, car il montre que la réaction anaphylactique cristallinienne n'est pas limitée à l'espèce. Ceci est absolument contraire à ce qui se passe pour le sérum et les autres organes, ainsi que l'admettent Rosenau et Anderson.

De l'ensemble des résultats de la deuxième série d'expériences, nous pouvions donc conclure d'une part à la spécificité d'organe ; d'autre part, des résultats de cette troisième série d'expériences semble résulter, au contraire, la non-spécificité d'espèce des réactions anaphylactiques cristalliniennes.

On pouvait donc arriver à considérer l'albumine cristallinienne comme se comportant vis-à-vis de l'organisme dont elle provient comme une substance étrangère ; il n'était même pas irrationnel de penser qu'on pourrait parvenir à anaphylactiser le cobaye, par exemple, pour son propre cristallin. C'est ce point que nous avons cherché à élucider dans la série d'expériences suivantes.

Quatrième série d'expériences. — Un animal préparé par une injection de substances albuminoïdes cristalliniennes provenant de *sa propre espèce* peut-il réagir à l'injection déchaînante de ces mêmes substances?

Douze cobayes furent, pour répondre à cette question, soumis à une injection sous-cutanée ou intrapéritonéale de 0 gr. 025 ou 0 gr. 05 de cristallin de cobaye en émulsion.

Seize jours plus tard, nous leur injectâmes à chacun 0 gr. 05 de cette même émulsion dans la veine. Aucun ne présenta le moindre trouble, ni de variation thermique. Deux témoins ne montrèrent à plus forte raison aucune réaction.

Nous soumîmes, quinze jours plus tard, six de ces mêmes cobayes à une seconde injection déchaînante de 0 gr. 05, qui ne fut non plus suivie d'aucun trouble.

Cette expérience très nette montre donc qu'il est impossible chez un animal d'obtenir des phénomènes anaphylactiques par l'injection préparante et par l'injection déchaînante de cristallin de sa propre espèce. Il semble donc bien difficile de souscrire à l'opinion de certains auteurs (Krusius) qui, non seulement admettent ces phénomènes d'auto-anaphylaxie, mais encore affirment qu'on peut les obtenir chez un cobaye préparé par une simple discision de la capsule de son cristallin. Mais peut-être est-il possible de provoquer dans certaines conditions chez le cobaye le choc anaphylactique par l'injection de cristallin de cobaye. La cinquième série de nos expériences a été faite pour répondre à cette question.

Cinquième série d'expériences. — Un animal préparé par une injection de substances albuminoïdes cristalliniennes provenant d'une *espèce étrangère* peut-il ensuite réagir à l'injection déchaînante de substances cristalliniennes de sa *propre espèce*?

Nous préparâmes dans ce but un lot de 10 cobayes par une injection intrapéritonéale d'extraits de cristallin : 4 furent traités par le cristallin de cheval (0 gr. 025), 3 par le cristallin de bœuf (0 gr. 025), 3 par le cristallin de mouton (0 gr. 025). Puis, après un temps moyen de quatre semaines, tous furent soumis à l'injection intraveineuse de cristallin de cobaye (0 gr. 025). Des 4 cobayes traités par le cristallin de cheval, 2 ne présentèrent aucun trouble, et 2 eurent des signes d'anaphylaxie moyenne avec hypothermie. Sur les 3 cobayes traités par le cristallin de bœuf, 1 ne réagit pas, 1 présenta des symptômes anaphylactiques assez graves et le dernier mourut de choc typique en quelques minutes. Quant aux 3 cobayes traités par le cristallin de mouton, ils présentèrent tous des signes d'anaphylaxie très nets, deux avec mort en quatre à cinq minutes et le troisième avec une hypothermie de 4 degrés.

Dans l'ensemble, sur 10 animaux, 7 ont donc présenté une réaction anaphylactique positive à l'injection de cristallin de leur propre espèce.

Il est donc possible par l'injection préparante de cristallin d'une espèce étrangère de sensibiliser le cobaye pour son propre cristallin.

Conclusions.

De l'ensemble de ces diverses expériences, résumées dans le tableau ci-joint, il semble qu'on puisse tirer les conclusions suivantes :

NATURE de l'injection préparante.	NATURE de l'injection déchaînante.	CAS D'ANAPHYLAXIE POSITIVE forte.	moyenne.	Total.	CAS d'anaphylaxie négative.	EXPÉRIENCES
Cristallin de cheval.	Cristallin de cheval.	8	5	13	4	Série 1
Cr. de bœuf.	Cr. de bœuf.	7	1	8	1	
Cr. de mouton.	Cr. de mouton.	5	4	9	3	
	Total...	.....	.....	30	8	
Cr. de cheval.	Sér. de cheval.	0	0	0	2	Série 2
Sér. de cheval.	Cr. de cheval.	0	0	0	6	
Cr. de bœuf.	Sér. de bœuf.	0	1	1	1	
Cr. de mouton.	Sér. de mouton.	0	1	1	2	
	Total...	.....	.....	2	11	
Cr. de cheval.	Cr. de bœuf.	1	1	2	2	Série 3
Cr. de cheval.	Cr. de mouton.	1	2	3	1	
Cr. de bœuf.	Cr. de cheval.	2	2	4	3	
Cr. de bœuf.	Cr. de mouton.	3	0	3	1	
Cr. de mouton.	Cr. de cheval.	2	5	7	4	
Cr. de mouton.	Cr. de bœuf.	0	1	1	0	
	Total...	.....	.....	20	11	
Cr. de cobaye.	Cr. de cobaye.	0	0	0	12	Série 4
	Total...	.....	.....	0	12	
Cr. de cheval.	Cr. de cobaye.	0	2	2	2	Série 5
Cr. de bœuf.	Cr. de cobaye.	1	1	2	1	
Cr. de mouton.	Cr. de cobaye.	2	1	3	0	
	Total...	.....	.....	7	3	

1° Un animal préparé par une injection de substances albuminoïdes cristalliniennes provenant d'une espèce étrangère donnée réagit presque toujours à l'injection déchaînante de cristallin de cette même espèce, le plus souvent à l'injection

déchaînante de cristallin d'espèces différentes, et presque jamais à l'injection déchaînante de sérum de la même espèce ;

2° Un animal ne peut réagir à l'injection déchaînante de cristallin de sa propre espèce que s'il a été préparé par une injection de cristallin d'espèce différente.

Le cristallin semble donc au point de vue des réactions anaphylactiques jouir de propriétés spéciales, paraissant différentes de celles de tous les autres organes et du sérum. Il est doué d'une véritable spécificité d'organe, puisque les animaux préparés par le cristallin d'une espèce quelconque ne réagissent pas au sérum de même espèce, et est au contraire dénué de toute spécificité d'espèce puisque ces animaux réagissent au cristallin, de quelque espèce qu'il provienne.

Ces faits semblent absolument contraires à ce qu'on observe dans l'anaphylaxie au sérum et aux extraits des autres organes. La spécificité des sérums est en effet presque absolue pour l'espèce. Ranzi a, d'autre part, montré que les animaux préparés par un extrait d'organe d'une espèce donnée réagissaient indistinctement aux extraits des différents organes et au sérum de la même espèce, mais jamais aux mêmes substances d'une espèce différente.

Il est possible d'admettre que ces propriétés des extraits d'organes sont dues au sérum qui y est toujours contenu. Des expériences de Minet et Bruyant semblent le prouver : en sensibilisant des cobayes par des extraits d'organes et en les anti-anaphylactisant ensuite par le sérum, ces auteurs ont obtenu des réactions anaphylactiques par injection d'extraits d'organes correspondants, qui semblent jouir d'une spécificité pour chaque organe; Pfeiffer va plus loin et nie presque la spécificité d'espèce.

Ces derniers faits nous rapprochent de ce que l'on observe pour le cristallin. Cet organe avasculaire, placé dans des conditions de nutrition très spéciales et uniques dans l'économie, jouirait de propriétés biologiques différentes de celles du sérum et par conséquent des autres organes qui en contiennent tous. Ce qui semble justifier cette hypothèse, c'est que le cristallin de l'embryon, organe encore vasculaire, possède une action

analogue à celle du sérum d'animaux de même espèce et que cette spécificité pour l'espèce, très nette au début, disparaît progressivement au cours du développement (von Szily).

La spécificité d'organe du cristallin n'est donc qu'un état secondaire, et semble liée aux conditions biologiques spéciales de cet organe chez l'adulte.

On peut, d'autre part, supposer que, si l'on parvenait à dissocier pour les autres extraits d'organes les propriétés anaphylactiques de ceux-ci et celles du sérum qu'ils contiennent, on obtiendrait dans leurs réactions anaphylactiques des résultats absolument comparables à ceux que l'on constate pour le cristallin; la spécificité de l'espèce serait alors uniquement une propriété du sérum.

Nous espérons, par des expériences ultérieures, arriver à vérifier cette hypothèse.

BIBLIOGRAPHIE DES TRAVAUX CITÉS

Andrejew. — Anaphylaxie mit Eiweiss tierischer Linsen. *Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte.* Bd XXX, Heft 2, S. 450, 1909.

Besredka. — De la vaccination anti-anaphylactique. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie de Paris*, 1908, p. 478-480.

Kapsenberg. — Die Anaphylaxie mit Linsensubstanz. *Zeitschr. für Immunit. und exp. Therapie, Orig.*, 1912, Bd. XV, p. 518.

Krusius. — Ueberempfindlichkeitsversuche vom Auge aus. *Arch. f. Augenheilk.*, 1910, S. 6.

— Bemerkungen zu der Arbeit von Rœmer und Gebb : « Beiträge zur Frage der Anaphylaxie, etc. ». *V. Graefe's, Arch. f. Opht.*, 1912, Bd. LXXXII, H. 1, p. 180.

Pfeiffer. — Zur Organspezificität der Ueberempfindlichkeit. *Zeitschr. f. Immunit., Orig.*, Bd VIII, H. 3, 1910.

Ranzi. — Ueber Anaphylaxie durch Organ- und Tumorextrakte. *Zeitschr. f. Immunit., Orig.*, Bd II, H. 1, S. 12-20, 1909.

Richet. — *L'anaphylaxie.* Alcan, Paris, 1912, 2e édition.

Rœmer (P.). — Die Pathogenese der Cataracta senilis vom Standpunkt der Serumsforschung. *Arch. f. Opht.* Bd IX, S. 175, 1905; Ergänzungsheft, S. 150, 1907,

Rœmer und Geff. — Beiträge zur Frage der Anaphylaxie durch Linseneiweiss und Eiweiss aus andern Geweben des Auges. *V. Graefe's, Arch. f. Opht.*, Bd LXXXI, H. 2, S. 367, 1912.

— Weiterer Beitrag zur Anaphylaxie mittels Linseneiweiss. *V. Graefe's. Arch. f. Opht.*, Bd LXXXIII, H. 3. S. 504, 1912.

— Weiterer Beitrag zur Frage der Anaphylaxie durch Linseneiweiss. *V. Graefe's, Arch. f. Opht.*, Bd LXXXIV, H. 1, S. 183, 1913.

Rosenau and Anderson. — Studies upon Hypersensibility and Immunity. *Public Health and marine Hosp. Bullet.*, Nr. 36, p. 1, 1907.

— Further Studies upon Anaphylaxis. *Hyg. Labor. Public Health and Med. Hosp. Serv. Bull.* Nr 45, 1908.

— A review of Anaphylaxis with special reference to Immunity. *Journ. of Inf. Diseases*, vol. V, p. 85.

Szily (Von). — Ueber die Organspezificität der ausgebildeten Linse und über ihre Artspezificität in embryonaler Zeit. *Klin. Monatsh. f. Augenh.*, Neue Folge, Bd XII, S. 150, 1911.

Uhlenhuth. — Zur Kenntniss der giftigen Eigenschaften des Blutserums. *Zeitschr. f. Hygiene*, Bd XXVI, S. 384, 1897.

— Komplementablenkung und Blut-Eiveissdifferenzierung. *Deutsche Med. Wochenschr.*, 1906.

Uhlenhuth und Hendel. — Untersuchungen über die praktische Verwertbarkeit der Anaphylaxie zur, etc. *Zeitschr. f. Immunit., Orig.*, Bd IV, H. 6, S. 761, 1910.

LA FLORE INTESTINALE DES LAPINS NOURRIS DE CAROTTES ET DES LAPINS SOUMIS A L'INANITION

par D. ROUGENTZOFF

(Travail du laboratoire de M. le professeur Metchnikoff.)

INTRODUCTION

L'étude actuelle apparaît comme un chaînon de toute une série de travaux sur la flore intestinale, qui ont été faits dans le laboratoire de M. le professeur Metchnikoff.

Dans ce travail, nous nous sommes efforcé d'étudier surtout la composition qualitative de la flore microbienne de l'intestin des lapins soumis aux deux régimes cités plus haut, et nous avons recherché quelle était la modification de cette flore, tant au point de vue qualitatif que quantitatif, modification à laquelle on doit s'attendre, vu les deux modes d'alimentation différents.

Cette comparaison présente d'autant plus d'intérêt qu'elle contribuera peut-être à l'étude de la question : pourquoi l'urine des lapins nourris avec des carottes ne contient jamais d'indoxyl, tandis que celle des lapins dans l'état d'inanition en contient toujours en assez grande quantité.

D'après l'opinion généralement admise, l'indican urinaire, dans la plupart des cas, tire son origine de l'indol, qui lui-même se forme dans l'intestin, grâce à la destruction des substances albuminoïdes. La marche habituelle de la destruction de ces substances est la suivante : sous l'action des ferments protéolytiques, pepsine, trypsine et érepsine, sécrétés par les organes de la digestion, les albuminoïdes se décomposent en acides monoaminés et diaminés. La désintégration se poursuit et les produits ultimes de la digestion, la tyrosine

et le triptophane, se décomposent sous l'influence des microbes et il se forme de l'indol, du scatol et des phénols. Ces substances, facilement résorbées par la muqueuse de l'intestin, pénètrent dans le sang; plus tard, elles sont amenées au foie, où elles se transforment en se combinant avec l'acide sulfurique, et enfin sont sécrétées avec l'urine sous forme de sulfoconjugués.

En partant de l'indol qui se forme dans l'intestin, on obtient dans l'urine l'indican. Cet indican doit avoir encore d'autres sources, car on avait remarqué qu'il augmentait dans les cas de foyers de suppuration : cancer ou empyème (Brieger, Ortweiler). Leyden, Blumenthal, Rosenfeld et Lewi ont trouvé l'augmentation de l'indican dans le diabète expérimental et dans l'intoxication par la phloridzine et l'acide oxalique.

Enfin Senator, Brieger et Rosenbach ont attiré l'attention sur l'augmentation de l'indican dans des cas d'anémie grave dans la chlorose en expliquant ce fait par la destruction des albumines des tissus par l'autolyse cellulaire exagérée.

L'origine de l'indican urinaire chez des animaux en état d'inanition fut l'objet de grandes discussions et de beaucoup de recherches.

Salkowsky, Jaffe, Senator, Blumenthal et beaucoup d'autres s'appuyaient sur la présence de l'indican dans l'urine des animaux en état d'inanition, pour s'élever contre la théorie de l'origine intestinale de l'indican urinaire. Les partisans de cette dernière théorie essayaient, au contraire, de la prouver en supposant, les uns qu'une hémorragie se produisait, pendant le jeûne, dans l'intestin et que la décomposition de ce sang devenait une source d'indican. Les autres croyaient que l'indicanurie chez des animaux à jeun dépendait de la putréfaction des sucs digestifs, très riches en albumine, et pour démontrer que l'intestin était le lieu de formation de l'indican, on a fait toutes sortes de recherches pour tracer un parallèle entre l'indican dans l'urine et l'indol dans l'intestin des animaux en état d'inanition.

Rosenfeld (1) a cherché l'indol dans les matières fécales des lapins à jeun, mais n'a pu le trouver que dans 5 cas seulement sur 34 qu'il avait étudiés.

Gauthier et Hervieu (2) ont cherché l'indican dans l'urine de quatre lapins et ont pu le constater déjà après le premier jour de jeûne. Le deuxième jour, sa quantité a beaucoup augmenté, pour diminuer le jour de la mort. L'urine prise dans la vessie au moment de la mort ne contenait pas trace d'indoxyl. Les mêmes auteurs ont analysé le contenu intestinal de ces lapins; ils ont extrait l'indol par la benzine et, dans tous les cas, la réaction

(1) *Beiträge für chem. Physiol. und Pathol.*, 589.
(2) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXIII, p. 223 et 610.

fut positive. Parallèlement, ils ont étudié le contenu du gros intestin d'un lapin, très bien nourri pendant trois jours de suite, et pas une trace d'indol n'a pu être constatée.

Ellinger (1) a trouvé trois fois sur quatre de l'indol dans les matières fécales des lapins à jeun.

Fr. Blumenthal a cherché l'indol dans le contenu intestinal des lapins à l'état d'inanition. Il distillait ce contenu avec un acide dilué, mais il n'a pas trouvé d'indol dans les quatre cas étudiés par lui.

Ury (2) avait montré que les selles contenant de l'indol et distillées avec un acide fort donnaient souvent un résultat négatif, pendant que les mêmes produits à distillation alcaline donnaient une assez grosse quantité d'indol.

Ury avait montré de plus que, pendant la distillation des fèces les premiers 20 ou 30 cent. cubes contenaient peu d'indol ou n'en contenaient pas du tout, tandis que les portions suivantes en donnaient beaucoup plus.

La technique de la recherche de l'indol dans le contenu intestinal fut ainsi perfectionnée et Fr. Blumenthal et Jacoby (3) se sont mis de nouveau à étudier la question de l'origine de l'indican chez des animaux à l'état d'inanition. Pour voir s'il y avait un parallélisme entre l'indoxyl dans l'urine et l'indol dans les matières fécales, ces auteurs ont fait leurs expériences sur deux groupes d'animaux : d'un côté, ils avaient des lapins qu'ils soumettaient à l'inanition, dont l'urine contenait une grosse quantité d'indican; de l'autre, des lapins nourris de choux-fleurs et de carottes, et dans l'urine desquels on ne trouvait pas d'indican.

Les conclusions de leurs recherches furent les suivantes :

1° L'intestin des lapins soumis à l'inanition contient encore beaucoup d'aliments au moment où leur urine contient beaucoup d'indican.

2° On ne remarque pas d'hyperémie ni d'hémorragie sur la muqueuse intestinale.

3° L'intestin grêle ne contient pas d'indol.

4° Le gros intestin en contient toujours.

Chez des lapins nourris de carottes et de choux-fleurs, on a vu que :

1° Leur urine ne contient pas d'indican;

2° Le produit de distillation du contenu de l'intestin grêle ne contient pas d'indol;

3° Le contenu du gros intestin en contient, mais pas toujours.

En se basant sur ces expériences, qui avaient pour but de constater le parallélisme entre l'augmentation de l'indol dans le contenu intestinal et de l'indican dans l'urine des lapins à l'état d'inanition, on aurait pu conclure que l'indican urinaire tirait, en effet, son origine de l'indol de l'intestin. Mais les deux auteurs précédents ne croient pas que la quantité d'indol trouvé puisse expliquer, d'une façon suffisante, l'indicanurie de ces animaux. Ils ont fait alors des injections sous-cutanées d'indol et, ayant constaté, aussitôt après, de l'indol dans le contenu intestinal, ils sont arrivés à cette conclusion qu'on ne pouvait savoir au juste si l'indol qu'on trouve dans les fèces des lapins en état d'inanition provenait de la putréfaction du contenu intestinal ou s'il y était déversé par le sang. Ils se sont mis alors à chercher de l'indol dans le sang circulant et dans les tissus des

(1) *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 38.
(2) *Deutsche med. Wochenschr.*, 1904, n° 19.
(3) *Biochemische Zeitschrift*, Bd XXIX, p. 472.

animaux en état d'inanition. Les résultats furent négatifs tandis qu'ils pouvaient toujours en constater dans le sang et les tissus des animaux auxquels l'indol fut injecté.

L'étude parallèle de la flore microbienne des lapins nourris de carottes et de ceux qu'on soumet à l'inanition pourrait, il nous semble, éclaircir ce problème très difficile.

Si nous savons que l'indican urinaire provient principalement de la putréfaction intestinale et si l'indican dans l'urine des animaux soumis à l'inanition a réellement cette origine, nous devrions constater également une modification correspondante dans la putréfaction intestinale des animaux à jeun et des animaux nourris de carottes et chez lesquels l'indican est absent.

Nous savons que l'indol, dans l'intestin, peut se former aux dépens de la destruction, par des microbes, des substances albuminoïdes qui traversent le tube intestinal. Si on pouvait, en étudiant la composition qualitative de la flore intestinale des lapins soumis à nos deux régimes, établir la modification de cette flore, en constatant soit l'apparition de nouveaux microbes protéolytiques, absents dans les conditions habituelles, et qui contribueraient à la formation de l'indol dans l'intestin, soit en constatant encore la diminution ou la disparition des microbes antagonistes de la putréfaction, et plus encore si on pouvait démontrer qu'en état d'inanition la proportion réciproque des microbes changeait dans le sens d'augmentation nette de ceux parmi eux qui produisent surtout de l'indol, et enfin si on pouvait remarquer dans le contenu intestinal la modification du milieu lui-même qui favoriserait les microbes donnant de l'indol, nous aurions, par là même, démontré que dans l'intestin des animaux en état d'inanition se trouvent réunies toutes les conditions favorables à la production d'indol et nous aurions pu supposer qu'en état d'inanition, l'indican est bien d'origine intestinale.

Voilà les problèmes que nous nous sommes posés en acceptant la thèse de M. Metchnikoff, thèse ayant pour but l'étude de la flore intestinale des lapins à l'état d'inanition.

Le travail actuel sera la description de toutes les données de nos recherches.

Nous avons divisé notre étude en deux chapitres : dans le premier nous décrirons l'étude qualitative de la flore intestinale des lapins nourris de carottes, et de ceux qui sont soumis à l'inanition dans le deuxième. Nous donnerons les résultats de nos recherches sur la modification quantitative du *B. coli* chez des lapins soumis à l'inanition et sur les variations de sa fonction, qui paraît être celle de former l'indol dans l'intestin des lapins nourris de carottes.

I

Étude qualitative de la flore intestinale des lapins nourris de carottes et des lapins soumis a l'inanition.

Pour nos recherches, nous avons adopté le plan suivant : onze lapins furent partagés en deux lots : un d'eux contenait cinq lapins (n°s 1, 2, 6, 7 et 11), le deuxième était composé de six (n°s 3, 4, 5, 8, 9 et 10). Les premiers ont été nourris exclusivement avec de la carotte ; les animaux du deuxième groupe, après avoir été longtemps nourris avec de la carotte, furent soumis au fur et à mesure à l'inanition. Chaque lapin avait sa cage spéciale, dans laquelle il y avait une sorte d'entonnoir pour l'urine et deux filets pour retenir les excréments. Le fond de la cage formait un filet à mailles très larges, ce qui faisait tomber les matières fécales aussitôt émises et ce qui empêchait en même temps les animaux à jeun de se nourrir de leurs propres excréments.

Pendant toute la durée de nos expériences, l'urine fut analysée tous les jours. Nous nous servions, pour chercher l'indoxyl, des réactions d'Obermayer, de Gracioni et Jaffé. Mais, plus tard, nous nous sommes arrêté à celle d'Obermayer en y apportant toutefois une petite modification. Nous nous servions du perchlorure de fer pur au lieu de le diluer dans de l'acide chlorhydrique. La marche de la réaction est la suivante : si l'urine contient du mucus (ce qui arrive à l'état d'inanition), on s'en débarrasse en ajoutant à l'urine 1/10 de son volume d'une solution à 20 p. 100 de sous-acétate de plomb et en faisant ensuite des filtrations successives. On prend ensuite

10 cent. cubes de cette urine, on y ajoute le même volume d'acide chlorhydrique, une goutte de perchlorure de fer et enfin une petite quantité de chloroforme. Après avoir bien agité, on laisse reposer les tubes à essai, les gouttes de chloroforme se déposant au fond et formant la couche inférieure.

Si l'urine contient de l'indican, la couche transparente de chloroforme prend une coloration bleue.

Pour la recherche de la flore du contenu intestinal, nous divisions, après avoir tué l'animal en expérience, son tube digestif en six parties : *a*) estomac ; *b*) duodénum ; *c*) partie inférieure de l'intestin grêle ; *d*) appendice ; *e*) côlon et *f*) rectum. Nous les transportions, avec toutes les précautions nécessaires, dans les boîtes de Petri et là nous débarrassions les parties du tube digestif de leur contenu. A l'aide de sérum physiologique, on fait de ce contenu une émulsion qu'on verse ensuite dans quatre tubes à essai. Deux de ces tubes furent chauffés à la température de + 80 degrés pendant 15 minutes.

Pour les recherches ultérieures, tous les quatre tubes (et ainsi pour toutes les parties du tube digestif) ont été portés à l'étuve ; pour faire pousser les microbes qui se trouvaient dans le mélange et pour créer des conditions favorables aux anaérobies, on a fait le vide dans deux des tubes. L'émulsion dans l'un de ces deux tubes fut chauffée et dans l'autre elle fut laissée à la température ordinaire.

Pour isoler les microbes de telle ou telle autre espèce, nous avons eu recours, suivant les propriétés biologiques de ces microbes, à des milieux de culture spéciaux.

En résumé, tout contenu de chaque partie du tube digestif avait subi les manipulations suivantes :

1° Isolement des microbes dans l'émulsion fraîche à l'aide des cultures en plaques (on faisait couler dans les boîtes de Petri de l'agar simple avec des ensemencements en stries, qu'on répétait aussi sur l'agar Drigalsky-Conradi) ;

2° Isolement des microbes dans l'émulsion fraîche à l'aide des cultures en plaques sur gélatine ;

3° Isolement des microbes sporulés dans l'émulsion fraîche, chauffée pendant quinze minutes à la température de 80 degrés à l'aide des cultures en plaques sur agar ;

4° Isolement des microbes anaérobies à l'aide de l'ensemen-

cement profond dans l'agar de Veillon, d'une émulsion fraîche chauffée et non chauffée ;

5° Isolement du *B. perfringens* : on ensemence l'émulsion fraîche dans du lait qu'on porte ensuite à l'ébullition pendant une minute ; après en avoir chassé l'air, on met les tubes pour vingt-quatre heures à l'étuve. Avec la culture obtenue, on fait des ensemencements profonds dans de l'agar sucré de Veillon, agar fondu et refroidi à 45 degrés pour avoir des colonies isolées ;

6° Isolement des anaérobies protéolytiques. L'émulsion, chauffée à 85 degrés pendant 15 minutes, est ensemencée dans le bouillon de Martin, additionné de l'albumine d'œuf coagulé. Les tubes, après que l'air en fut chassé, sont placés pour quelques jours à l'étuve et ensuite on en a fait des ensemencements dans l'agar glucosé de Veillon pour obtenir des colonies isolées ;

7° Isolement des microbes acidophiles : le contenu frais de l'intestin est ensemencé dans du bouillon glucosé auquel on ajoute 1/2 à 1 p. 100 d'acide acétique ou lactique. Deux ou cinq jours après, on procède à l'isolement des microbes en ensemençant la culture de ces tubes dans l'agar glucosé de Veillon fondu et refroidi à 43 degrés ;

8° Pour différencier les microbes de l'hémicellulose, on prenait le contenu frais chauffé et on l'ensemençait dans le milieu d'Omeliansky. On mettait les tubes pour quelques jours à l'étuve et on réensemençait ensuite dans de l'agar fondu et refroidi ;

9° Pour isoler les mêmes microbes de l'hémicellulose, on remplaçait le milieu d'Omeliansky par un autre, composé d'une solution de sérum physiologique dans lequel fut placé un morceau de pomme de terre ;

10° Pour séparer les microbes amylolytiques, on procédait de la même façon que dans les cas précédents, mais, comme milieu préalable de la pullulation des microbes, on prenait une solution d'amidon ;

11° Pour isoler les microbes protéolytiques aérobies, on ensemençait le contenu chauffé dans le milieu de culture d'Achalme-Passini. Après quelques jours à l'étuve, on faisait la séparation des microbes à l'aide des cultures en plaques sur agar.

Pour isoler le *B. Proteus*, on se servait de la méthode de Schoukewitch (1), qui consiste à ensemencer le contenu de l'intestin dans l'eau de condensation de l'agar incliné. Le *B. Proteus*, comme microbe mobile, forme à la surface de l'agar un voile allant de bas en haut.

Toutes les manipulations ont été refaites ultérieurement avec le contenu intestinal, auquel on a fait subir la putréfaction en respectant les conditions nécessaires à la vie aérobie et anaérobie. Ainsi des tubes qui ont subi la putréfaction dans des conditions aérobies furent réensemencés pour isoler le *B. Proteus*; les mêmes tubes, mais chauffés pendant quinze minutes à 80 degrés, servaient pour isoler les aérobies sporulés; le contenu des tubes qui ont subi, après chauffage préalable, la putréfaction dans les conditions anaérobies, servait pour séparer les anaérobies; on faisait, avec les mêmes, des ensemencements en vue des anaérobies protéolytiques (§§ 6 et 7). Les tubes dans lesquels le contenu intestinal subissait la putréfaction sans chauffage préalable servaient pour faire les manipulations (§§ 8, 9, 10).

Les colonies isolées de microbes que nous avons obtenues ont été étudiées dans tous les milieux nutritifs à tous les stades de leur développement et nous avons recherché également leur pouvoir pathogène.

Nous donnerons plus loin l'énumération simple de tous les microbes que nous avons trouvés dans le contenu de l'intestin de nos deux groupes de lapins.

A. — Flore intestinale des lapins nourris exclusivement de carottes.

Avant de commencer à décrire et à énumérer les microbes que nous avons trouvés chez des lapins soumis au régime de carottes, nous donnerons un tableau général de cette flore telle qu'elle se présente sur des préparations faites avec de l'émulsion du contenu de telle ou telle partie du tube digestif et colorées d'après la méthode de Gram.

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, 1911, p. 255.

Un frottis, fait avec le contenu de l'estomac, nous montre beaucoup de microbes; mais, vu que la plupart d'eux se colorent partiellement (granulation) ou se colorent faiblement, vu qu'ils présentent presque tous une granulation, nous pensons que les microbes périssent dans l'estomac. A côté des bâtonnets ne prenant pas le Gram, nous en trouvons une grande quantité qui se colorent très fortement par le Gram. On y trouve également des cocci et des diplocoques prenant le Gram.

Les frottis faits avec le contenu du duodénum nous frappent par le peu de microbes qu'on y rencontre. D'après leur forme et leur manière de se colorer, on peut conclure qu'il s'agit surtout de formes dégénérées.

Sur les frottis, faits avec le contenu de la partie inférieure de l'intestin grêle, nous trouvons un peu plus de microbes, parmi lesquels beaucoup en voie de dégénérescence. Il y a des cocci et diplocoques tantôt prenant, tantôt ne prenant pas le Gram. On y voit aussi des bâtonnets prenant le Gram, et dans quelques-uns on remarque des spores qui sont restées incolores.

Le tableau change brusquement quand on met sous le microscope un frottis fait avec le contenu de l'appendice. Une quantité énorme de microbes apparaît dans le champ du microscope. Ce sont, pour la plupart, de petits bâtonnets ne prenant pas le Gram et rappelant par leur forme le *B. coli*. Au milieu d'eux, on trouve, mais en quantité beaucoup moindre, des bâtonnets plus grands, munis souvent de spores, se colorant par le Gram et nous rappelant, par leur forme, les bactéries du groupe *Subtilis-Megatherium*. Par-ci, par-là, quelques cocci et diplocoques.

Le frottis, fait avec le contenu du côlon, nous fait voir dans le microscope le même tableau que le précédent.

Dans le rectum, on trouve peut-être plus de formes dégénérées et encore plus de formes bacillaires prenant le Gram.

Les préparations que nous venons de décrire ont été faites avec le contenu du tube digestif d'un seul lapin (n° 2). Le tableau microscopique varie d'un lapin à l'autre. Chez les uns, ce sont des bactéries du type *B. coli* qui sont en plus grand nombre. Chez d'autres, ce sont les formes bacillaires prenant le Gram qui prédominent.

En nous servant des méthodes d'isolement que nous avons décrites plus haut, nous avons pu mettre en évidence les microbes suivants :

a) Parmi les microbes protéolytiques, aérobies et anaérobies facultatifs, nous avons eu très souvent : *B. megatherium*, quelques variétés de *B. mesentericus*, *fuscus*, *ruber*, *multipediculus* et d'autres. Beaucoup plus rarement nous avons rencontré *B. subtilis*, *Staphyloccus albus* et *aureus*, *Sarcina flava* et dans un cas : *B. proteus vulgaris*. En outre, nous avons isolé douze espèces de microbes protéolytiques que nous

n'avons pas pu identifier et qui doivent être rapportés à des hôtes accidentels de l'intestin.

b) Parmi les aérobies non protéolytiques et les anaérobies facultatifs, nous avons toujours pu isoler le *B. coli* et une espèce en forme de bacille, que nous n'avons pas pu identifier. Nous avons rencontré également l'*Enterococcus saccharomyces* et enfin sept espèces de microbes observés à chaque étude une seule fois et que nous n'avons pas identifiés.

c) Parmi les microbes acidophiles, nous avons isolé deux fois *B. acidophilis* Moro, et une fois dans chaque cas *B. acidophilis* Merechkowsky n° 1, *B. bifidus* et deux fois un *coccobacille*.

d) Parmi les anaérobies, nous avons rencontré chez les lapins *B. perfringens* et ensuite nous avons vu très souvent *B. putrificus*, *B. sporogenes A* et *B* et enfin *B. paraputrificus*.

B. — Flore intestinale des lapins en état d'inanition.

Avant d'entrer dans la description des microbes isolés, nous allons faire comme précédemment et donner un tableau général de la flore microbienne telle qu'elle se présente à nos yeux sous le microscope, et nous noterons, chemin faisant, la différence de nos préparations avec celles que nous avons faites avec le tube digestif des lapins nourris de carottes.

Dans l'estomac, nous trouvons, au milieu d'un petit nombre de cocci, des microbes ayant la forme de bacilles. La plupart de ces microbes sont en voie de dégénérescence, ce qui nous explique peut-être pourquoi nous y trouvons si peu de microbes prenant le Gram, malgré que le nombre total de microbes soit plus grand que dans le contenu de l'estomac du lapin nourri de carottes.

Dans le duodénum, on voit dans le champ du microscope beaucoup plus de microbes que dans la même partie de l'intestin d'un lapin normal. La plupart des bactéries présentent une forme d'involution et ceux qui se colorent par le Gram le prennent partiellement. On ne remarque pas de formes en coccus. La partie inférieure de l'intestin grêle contient un grand nombre de bactéries ayant la forme des bacilles. De temps en temps, on y aperçoit des microbes prenant le Gram. Très peu de formes en coccus. Le tableau de ces frottis est différent de ceux que nous avons vus chez le lapin normal.

Sur les frottis du contenu de l'appendice, un nombre colossal de microbes ayant exclusivement la forme de bacilles. De place en place, des bacilles se colorant par le Gram. Beaucoup de formes d'involution. On trouve parmi les bacilles qui ont perdu la propriété de prendre le Gram quelques-uns munis de spores.

Le peu de bactéries qui prennent le Gram différencient ces frottis de ceux pris chez des lapins normaux. Le contenu du côlon et du rectum ne diffère presque en rien de celui de l'appendice du même lapin.

Le nombre beaucoup plus grand de bactéries sur les frottis faits avec le contenu de l'estomac, du duodénum et de la partie inférieure de l'intestin grêle des lapins en état d'inanition paraît être un fait généralement observé.

Passons maintenant à l'énumération des microbes isolés par les mêmes procédés dont nous nous sommes servis pour le premier lot de lapins :

a) Parmi les microbes aérobies et anaérobies facultatifs, nous avons eu très souvent *B. megatherium*, quelques espèces des *B. mesentericus*, *fuscus*, *vulgatus*, *multipediculus* et d'autres; *B. subtilis*, *mycoides*; assez souvent nous rencontrions *Staphylococcus albus* et *Sarcina flava*, et une fois dans chaque cas : *Coccus flavus* et *aurantiacus*, *Sarcina citrea* et *aurantiaca*, *B. pyocyaneus*. En outre, nous avons isolé dix autres espèces de bacilles que nous n'avons pas identifiés et deux moisissures.

b) Comme aérobies non protéolytiques et anaérobies facultatives, nous avons toujours trouvé le *B. coli* et, comme dans le groupe précédent d'ailleurs, un petit bâtonnet, que nous n'avons pas identifié. Nous avons rencontré encore *Enterococcus sacharomyces*, et une fois *B. coli* typhomorphe (Tissier). En outre nous avons vu 10 microbes non identifiés par nous.

c) Parmi les microbes acidophiles, nous avons isolé le *Coccobacillus* et encore une espèce que nous avons reconnue être le *B. clostridioformis*.

d) Parmi les anaérobies protéolytiques, nous avons rencontré chez tous les lapins le *B. perfringens* et très souvent le *B. sporogenes* et le *B. putrificus*.

e) Comme anaérobies non protéolytiques, nous avons rencontré une fois dans chaque cas le *B. Rodella III*, et encore deux formes que nous n'avons pas pu identifier.

En comparant la flore intestinale des lapins nourris de carottes et de ceux qui ont été soumis à l'inanition, nous voyons qu'au point de vue des microbes protéolytiques, la différence n'est pas grande. Chez les uns et chez les autres nous avons également rencontré parmi les anaérobies : *B. perfringens*, *B. putrificus* et *B. sporogenes*; parmi les aérobies : *B. megatherium*, *mesentericus* et d'autres.

Il faut remarquer cependant que le *B. perfringens*, *B. putrifiéus* et *B. sporogenes* peuvent être isolés en nombre beaucoup plus grand chez les lapins en état de jeûne. Cette constatation ne doit pas être perdue de vue quand on étudie les conditions dans lesquelles l'indol se forme dans l'intestin des animaux à jeun. Ces microbes sont parmi les microbes protéolytiques les plus énergiques; et même quelques variétés de *B. sporogenes* produisent elles-mêmes de l'indol. En tout cas, elles préparent le terrain à ceux des microbes qui, comme le *B. coli*, jouent un très grand rôle dans la production d'indol. Ainsi l'augmentation du nombre de ces microbes dans l'intestin des animaux à jeun doit favoriser la production d'indol.

La différence entre les deux flores paraît plus nette, quand on y étudie les microbes acidophiles : ce qui frappe, c'est l'absence totale dans l'intestin des animaux en état d'inanition de *B. Moro*, et de *B. Mereschkowsky* et aussi de *B. bifidus*. Ceci est important, car les microbes acidophiles sont de grands antagonistes de ceux qui décomposent les albumines. Malheureusement, la technique actuelle ne permet pas de donner la notion exacte du nombre de ces microbes dans l'intestin des lapins, nourris de carottes.

En résumé et en nous basant sur l'étude de la flore intestinale, nous pouvons conclure que le *B. coli* est le plus grand producteur d'indol dans l'intestin des animaux à jeun. Nous avons trouvé ce microbe dans l'intestin de nos deux lots de lapins, et le fait que la production d'indol est plus riche chez des animaux à jeun doit être attribué soit à l'augmentation du *B. coli* chez ces derniers, soit à la création de conditions spéciales, qui favoriseraient la fonction indolique de ce microbe.

II

De la variation quantitative du *B. coli* chez les lapins soumis a l'inanition et de la modification de sa fonction indolique dans l'intestin des lapins nourris de carottes exclusivement.

Nos recherches sur la composition qualitative de la flore intestinale des lapins nourris de carottes exclusivement et de ceux qu'on avait soumis à l'inanition ne nous donnent pas encore

la raison de la production exagérée d'indol dans l'intestin des animaux en état d'inanition et par cela même ne nous expliquent pas l'augmentation de l'indican dans l'urine de ces mêmes lapins.

En faisant avec des excréments des ensemencements en stries (ou sur agar dans les boîtes de Petri), nous avons remarqué que les excréments des lapins à jeun donnaient un nombre des colonies de *B. coli* plus grand que les matières fécales des lapins nourris de carottes. Ceci nous a fait supposer qu'il se créait pendant l'inanition des conditions spéciales, dans lesquelles le *B. coli*, producteur principal de l'indol dans l'intestin, pouvait se développer librement et donner de l'indol aux dépens des peptones qui se trouvent dans l'intestin.

Nous avons voulu vérifier notre supposition. La marche de nos recherches fut la suivante : les lapins qui ont servi à nos expériences ont été mis pendant un temps assez long (un à deux mois) au régime des carottes. Tous les jours nous cherchions l'indican dans leur urine. Ensuite, au bout d'un certain temps, nous établissions le nombre moyen de colonies de *B. coli*, poussé sur agar, ensemencé avec l'anse de platine chargée de l'émulsion faite des excréments.

La concentration de l'émulsion pour le même lapin fut la même, mais pour des lapins différents, cette concentration variait en raison inverse de la quantité de *B. coli* contenue dans une unité, qui est l'anse de platine.

L'émulsion pouvait servir à l'expérience, quand l'anse de platine chargée une *seule* fois donnait 10 à 20 colonies.

Le produit, qui fut l'objet de nos recherches, était cueilli de la façon suivante : on mettait sous le fond à mailles larges de la cage du lapin un papier à filtrer très propre, sur lequel venaient tomber les excréments du lapin. Nous nous servions pour nos recherches de matières fécales fraîches. Avec une petite pince stérile, on en pesait sur une balance de précision 1 gramme, qu'on écrasait soigneusement dans 10 cent. cubes de sérum physiologique. De cette émulsion à 1 p. 10 on en faisait d'autres dilutions : 1 p. 100, 1 p. 1.000, 1 p. 8.000 et ainsi de suite. Pour rechercher laquelle de ces dilutions convenait mieux pour les ensemencements, nous prélevions chaque fois la quantité d'émulsion, avec laquelle on pouvait charger une anse de platine normale. Pour obtenir les colonies du *B. coli*, et pour leur numération, nous nous servions, les premiers temps, de deux procédés :

1° Nous faisions des ensemencements dans des tubes à agar simple fondu et refroidi à 43 degrés. Nous introduisions l'anse de platine en l'agitant. On plaçait ensuite les tubes dans une position verticale. Pour éviter toutes sortes

d'éventualités on chargeait de la même émulsion 10 anses et on ensemençait 10 tubes :

2° Nous faisions avec l'anse de platine, chargée de l'émulsion des ensemencements en stries sur la surface de l'agar coulé dans des boîtes de Petri et refroidi. (Agar Drigalsky-Conradi.)

On prenait 10 anses de platine comme auparavant.

Les colonies poussaient au bout de vingt-quatre heures (à peu d'exceptions près toutes furent des colonies de *B. coli*), on en faisait la numération dans lesdits tubes et en prenant le chiffre moyen, nous obtenions l'indicateur de la quantité de *B. coli* dans l'unité d'excréments du jour même.

Il faut remarquer que les colonies ensemencées dans les boîtes de Petri, devenaient souvent confluentes et rendaient par là la numération difficile, nous nous sommes arrêté au premier procédé.

Nous donnons dans le tableau ci-contre le résultat de nos recherches quantitatives sur le *B. coli*, chez dix lapins (n°s 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21) soumis à l'inanition. Les lapins n°s 12, 13, 14, 15 et 16 furent tués au moment de la grosse indicanurie; les lapins n°s 18, 19, 20, 21 ont succombé à l'inanition.

Tout en faisant nos recherches quotidiennes sur la quantité des germes de *B. coli* dans les excréments, nous analysions également, tous les jours, l'urine au point de vue de l'indican et ceci pour voir s'il y avait un parallélisme entre l'augmentation du *B. coli* dans les matières fécales et celle de l'indican dans l'urine.

En ramenant le nombre des colonies à un chiffre moyen, voici ce que nous avons vu chez nos lapins :

Lapin n° 12. — Pendant qu'une anse de platine chargée de l'émulsion d'excréments à 1 p. 1.000 donnait en moyenne avant l'inanition 2,2 colonies pour un tube, la même émulsion, après 2 jours de jeûne, donnait déjà 4,4, et, après 3 jours, quand on trouve dans l'urine une grosse quantité d'indican, on obtient avec la même émulsion 35,8 colonies pour un tube.

Lapin n° 13. — Avant l'inanition : de 15,5 à 24 colonies (toujours avec une anse de platine et l'émulsion à 1 p. 1.000).

Après 24 heures de jeûne : 28,8.

Après 2 jours de jeûne : 39,0 avec beaucoup d'indican dans l'urine.

Lapin n° 14. — Avant l'inanition, avec une émulsion à 1 p. 100 : 3 colonies; 2 jours après, quand l'indican apparaît dans l'urine en quantité considérable, on trouve : 7,2 colonies.

Lapin n° 15. — Avant l'inanition, l'anse avec l'émulsion à 1 p. 1.000 donne : 20,5 colonies pour un tube.

Après 2 jours d'inanition : 26,3 et de l'indican dans l'urine.

LAPINS et DATES	OBSERVATIONS	INDICAN	DILUTION	NOMBRE DE COLONIES		
				Par tube	Total	Moyenne
Année 1912.						
N° 12						
29 oct.	Avant l'inanition.	0	1/500	5, 4, 1, 5, 6, 6, 10, 6, 4, 1	48	4,8
		0	1/1.000	1, 6, 2, 3, 4, 1, 3, 0, 2, 0	22	2,2
30 —	Pas d'excréments.	0				
31 —	Après 2 j. d'inan.	0	1/500	8, 10, 7, 10, 4, 4, 10, 6, 8, 8	85	8,5
		0	1/1.000	» » » » » 4, 5, 5, 7, 1	22	4,4
1er nov.	Après 3 j. d'inan.	+++	1/1.000	34, 56, 35, 29, 33, 34, 36, 37, 34, 30	358	35,8
N° 13						
21 oct.	Avant l'inanition.	0	1/1.000	14, 14, 15, 13, 9, 16, 19, 24, 19, 12	155	15,5
22 —	»	0	1/1.000	» » » » » 22, 24, 22, 28, 25	121	24,0
			1/2.000	» » » » » 14, 12, 12, 8, 6	52	10,4
23 —	»	0	1/2.000	12, 7, 18, 13, 7, 10, 13, 8, 10, 5	103	10,3
24 —	Après 24 h. d'inan.	0	1/2.000	19, 11, 13, 14, 18, 10, 18, 14, 14, 13	144	14,4
25 —	Après 2 j. d'inan.	+++	1/2.000	16, 21, 22, 17, 20, 23, 18, 22, 23, 13	195	19,5
N° 14						
3 oct.	Avant l'inanition.	0	1/100	3, 2, 1, 2, 8, 8, 3, 3, 0, 0	30	3,0
4 —	Pas d'excréments.	0				
5 —	2 j d'inanition.	+++	1/100	8, 6, 6, 8, 8, 2, 6, 12, 10, 6	72	7,2
»	3e et 4e j. pas d'exc.	+++				
8 —	5 j. d'inanition.	+++	1/100	» » » » » 8, 8, 8, 15, 14	53	10,6
N° 15						
15 oct.	Avant l'inanition.	0	1/1.000	18, 19, 21, 23, 23, 23, 18, 20, 19, 21	205	20,5
17 —	2 j. d'inanition, beaucoup de pigm.	+	1/1.000	22, 24, 21, 24, 24, 26, 38, 22, 24, 38	263	26,3
	Tué après 3 jours d'inanition.	+++				
N° 16						
22 oct.	Avant l'inanition.	0	1/15.000	12, 13, 16, 10, 9, 8, 9, 9, 13, 13	112	11,2
23 nov.	»	0	1/15.000	9, 4, 5, 5, 6, 4, 10, 2, 7, 3	55	5,5
25 —	»	0	1/15.000	7, 5, 7, 2, 7, 2, 4, 1, 2, 5	42	4,2
26 —	»	0	1/15.000	8, 5, 2, 3, 3, 8, 7, 3, 7, 3	49	4,9
27 —	»	0	1/15.000	4, 5, 1, 3, 2, 3, 1, 3, 8, 4	34	3,4
28 —	1 j. d'inanition.	++	1/15.000	3, 6, 8, 10, 4, 4, 2, 6, 4, 3	50	5,0
29 —	2 jours.	+++	1/15.000	86, 75, 90, 72, 70, 90, 90, 60, 85, 69	787	78,7
N° 17						
29 nov.	Avant l'inanition.	0	1/500	2, 2, 2, 2, 4, 4, 3, 4, 2, 1	26	2,6
30 —	»	0	1/500	1, 2, 4, 1, 2, 0, 0, 1, 1, 3	15	1,5
2 déc.	»	0	1/500	1, 2, 1, 3, 3, 3, 1, 5, 1, 4	24	2,4
4 —	»	0	1/500	2, 1, 1, 1, 2, 1, 1, 2, 0, 1	12	1,2
5 —	1 j. d'inan., pigm.	0	1/500	6, 3, 4, 2, 1, 5, 1, 2, 3, 3	30	3,0
6 —	2 j. d'in., pas pigm.	0	1/500	10, 13, 12, 10, 16, 10, 14, 13, 11, 11	120	12,0
7 —	3 j. d'inanition.	+++	1/500	12, 14, 14, 17, 18, 17, 13, 15, 21, 20	161	16,1
	4e j. d'in., pas d'exc.	++				
9 —	5e j. d'in. ; meurt.	+	1/500	49, 51, 53, 43, 64, 64, 52, 54, 63, 75	568	56,8
Année 1913.						
N° 18						
2 janv.	Avant l'inanition.	0	1/1.000	4, 4, 6, 3, 4, 5, 3, 5, 5, 3	42	4,2
4 —	»	0	1/1.000	4, 3, 4, 4, 5, 3, 3, 4, 3, 3	36	3,6
5 —	»	0	1/1.000	3, 5, 3, 4, 4, 5, 4, 5, 4, 4	41	4,1
6 —	24 h. d'inanition.	+	1/1.000	9, 14, 9, 15, 12, 12, 12, 11, 9, 13	116	11,6
7 —	2 j. d'inanition.	++	1/1.000	13, 12, 10, 10, 15, 10, 12, 11, 16, 10	119	11,9

LAPINS et DATES	OBSERVATIONS	INDICAN	DILUTION	NOMBRE DE COLONIES — Par tube	Total	Moyenne
Année 1913.						
N° 18						
8 janv.	3 j. d'inanition.	+ + +	1/1.000	20, 20, 17, 22, 17, 12, 18, 20, 18, 15	179	17,9
9 —	Pas d'excréments.	+ + +				
10 —	Pas d'excréments.	+ + +				
11 —	6 j. d'inanition.	+	1/1.000	65, 80, 88, 85, 99, 97, 73, 85, 82, 79	824	82,4
12 —	Mort ap. 7 j. d'inan.	0				
N° 19						
11 janv.	Avant l'inanition.	0	1/15.000	8, 7, 9, 10, 10, 5, 5, 9, 8, 7	78	7,8
12 —	»	0	1/15.000	7, 10, 9, 8, 10, 7, 8, 8, 6, 6	79	7,9
13 —	»	0	1/15.000	2, 4, 2, 2, 6, 3, 4, 3, 3, 4	33	3,3
14 —	»	0	1/15.000	4, 2, 2, 3, 3, 3, 6, 3, 3, 2	31	3,1
15 —	»	0	1/15.000	2, 3, 4, 6, 5, 3, 3, 3, 4, 4	37	3,7
16 —	1 j. d'inanition.	0	1/15.000	2, 4, 4, 2, 4, 4, 2, 3, 5, 2	32	3,2
17 —	2 j. d'inanition.	+ +	1/15.000	7, 5, 4, 5, 4, 3, 7, 5, 5, 5	50	5,0
18 —	3 j. d'inanition.	+ + +	1/15.000	20, 22, 23, 19, 25, 24, 22, 23, 17, 21	216	21,6
19 —	4 j. d'inanition.	+ + +	1/15.000	24, 29, 20, 20, 26, 22, 31, 19, 17, 24	232	23,2
20 —	Pas d'excréments.	+ + +				
21 —	Pas d'excréments.	+ + +				
22 —	7 j. d'inanition.	+ + +	1/15.000	3, 2, 3, 1, 1, 2, 3, 1, 2, 0	18	1,8
23 —	8 j. d'inanition.	+ + +	1/15.000	1, 2, 2, 5, 3, 3, 3, 1, 1, 2	23	2,3
24 —	9 j. d'inanition.	+ + +	1/15.000	5, 7, 8, 8, 5, 8, 5, 4, 5, 6	61	6,1
25 —	10 j. d'inanition.	+ +	1/15.000	3, 1, 2, 3, 3, 2, 2, 1, 5, 3	25	2,5
26 —	11 j. d'inan., meurt.	Traces.	1/15.000	4, 4, 4, 5, 4, 4, 4, 6, 3, 2	40	4,0
N° 20						
18 janv.	Avant l'inanition.	0	1/100	2, 3, 2, 2, 5, 3, 2, 2, 4, 2	27	2,7
19 —	»	0	1/100	6, 2, 6, 2, 5, 2, 4, 4, 2, 4	37	3,7
20 —	»	0	1/100	7, 3, 5, 4, 4, 3, 3, 5, 4, 3	41	4,1
21 —	»	0	1/100	3, 3, 3, 2, 1, 3, 1, 1, 3, 3	23	2,3
22 —	»	0	1/100	6, 7, 6, 4, 7, 5, 6, 4, 7, 6	58	5,8
23 —	»	0	1/100	3, 8, 4, 7, 6, 7, 4, 4, 7, 9	59	5,9
24 —	1 j. d'inanition.	0	1/100	8, 8, 6, 8, 10, 11, 9, 6, 9, 10	85	8,5
25 —	2 j. d'inanition.	+ +	1/100	10, 14, 8, 9, 14, 10, 16, 12, 9, 11	113	11,3
26 —	3 j. d'inanition.	+ + +	1/100	16, 16, 13, 13, 15, 13, 11, 17, 16, 14	144	14,4
27 —	4 j. d'inanition.	+ + +	1/100	20, 17, 21, 24, 21, 11, 17, 20, 19, 17	187	18,7
28 —	5 j. d'inanition.	+ + +	1/100	3, 2, 3, 3, 2, 5, 4, 2, 3, 5	32	3,2
	Meurt le 6e jour.	+				
N° 21						
11 fév.	Avant l'inanition.	0	1/1.000	5, 4, 5, 5, 4, 3, 6, 4, 5, 2	43	4,3
12 —	»	0	1/1.000	4, 3, 4, 9, 2, 9, 6, 3, 4, 7	51	5,1
13 —	»	0	1/1.000	3, 3, 3, 6, 10, 8, 3, 3, 6, 4	51	5,1
14 —	»	0	1/1.000	5, 8, 11, 13, 12, 12, 6, 6, 12, 8	93	9,3
15 —	»	0	1/1.000	8, 9, 8, 9, 8, 8, 10, 5, 5, 8	78	7,8
17 —	»	0	1/1.000	7, 10, 17, 13, 7, 13, 11, 15, 7, 8	105	10,5
18 —	»	0	1/1.000	6, 7, 4, 4, 3, 10, 7, 6, 10, 6	63	6,3
19 —	»	0	1/1.000	12, 9, 7, 7, 13, 12, 8, 12, 15, 12	107	10,7
20 —	»	0	1/1.000	9, 6, 10, 9, 8, 4, 5, 10, 6, 6	73	7,3
21 —	»	0	1/1.000	4, 4, 3, 3, 2, 2, 4, 2, 2, 4	32	3,2
22 —	»	0	1/1.000	10, 5, 9, 7, 10, 5, 6, 5, 6, 6	69	6,9
24 —	»	0	1/1.000	3, 4, 2, 3, 4, 2, 1, 2, 2, 1	24	2,4
25 —	»	0	1/1.000	3, 10, 5, 8, 6, 10, 8, 3, 8, 4	65	6,5
26 —	»	0	1/1.000	4, 3, 6, 4, 3, 2, 2, 5, 3, 4	36	3,6
27 —	»	0	1/1.000	3, 5, 8, 5, 3, 3, 4, 4, 4, 6	45	4,5

LAPINS et DATES	OBSERVATIONS	INDICAN	DILUTION	NOMBRE DE COLONIES Par tube	Total	Moyenne
Année 1913.						
N° 21 (Suite)						
28 fév.	1 j. d'inanition.	0	1/1.000	55, 52, 53, 57, 58, 65, 56, 47, 70, 75	572	57,2
1er mars	2 j. d'inanition.	+	1/10.000	9, 6, 10, 9, 11, 8, 9, 11, 6, 6	88	88
2 —	3 j. d'inanition.	+++	1/10.000	26, 22, 24, 28, 22, 23, 30, 24, 29, 30	258	278
3 —	4 j. d'in., pas d'exc.	+++				
4 —	5 j. d'inanition.	+++	1/10.000	36, 38, 44, 31, 56, 44, 36, 35, 35, 33	427	427
5 —	6 j. d'inanition.	+++	1/10.000	120, 95,100, 90,110,100, 90,120,100, 90	1.015	1.015
6 —	7 j. d'in., pas d'exc.	+++				
7 —	8 j. d'inanition.	+++	1/100.000	13, 14, 17, 16, 15, 15, 16, 18, 18, 14	156	1.560
8 —	9 j. d'inanition.	+	1/100.000	36, 46, 35, 40, 30, 38, 40, 47, 33, 37	382	3.820
	Meurt le 10e j. d'in.	+				

Lapin n° 16. — Avant l'inanition, avec l'émulsion à 1 p. 15.000, de 3,4 à 4,9 colonies; 24 heures après : 5 colonies; 2 jours après : 18,7 colonies, et beaucoup d'indican dans l'urine. Après 3 jours d'inanition : 72,2, toujours d'une seule anse.

Lapin n° 17. — Avant l'inanition d'une seule anse, avec l'émulsion à 1 p. 500 : 1,2 à 2,6 colonies; 24 heures après : 3 colonies; 2 jours après : 12 colonies; 3 jours après : 16 colonies, et beaucoup d'indican dans l'urine.

Après 5 jours : 5,68 colonies, pour une anse et un tube.

Le 6e jour de jeûne, le lapin meurt, et, si on cherche à ce moment-là de l'indican dans l'urine, on en trouve très peu.

Lapin n° 18. — Avant l'inanition, une anse d'émulsion à 1 p. 1.000 donnait : 3,6 à 4,2 colonies; 24 heures après : 11,6; 2 jours après : 11,9; 3 jours après : 17,9, et une grosse quantité d'indican dans l'urine. Après 6 jours de jeûne : 82,4 colonies.

Le 7e jour, l'animal meurt, et, dans l'urine, des traces d'indican.

Lapin n° 19. — Avant l'inanition, une anse d'émulsion à 1 p. 15.000 donnait : 3,1 à 3,7 colonies; 24 heures après : 3,2; 2 jours après : 5 colonies; après 3 jours d'inanition : 21,6, et beaucoup d'indican. Après 4 jours : 23,2. Deux jours de suite, pas d'excréments du tout.

Après 7 jours d'inanition, on n'obtient que 1,8 colonies, avec cependant beaucoup d'indican dans l'urine.

Après 8 jours : 2,3; après 9 jours : 6,1; après 10 jours : 2,5, avec peu d'indican.

Après 11 jours de jeûne : 4 colonies, et l'indican absent dans l'urine. Le 12e jour, l'animal meurt.

Lapin n° 20. — Avant l'inanition, on obtenait, avec une anse d'une émulsion à 1 p. 1.000 : de 2,3 à 5,9 colonies; après 24 heures : 8,5; après 2 jours : 11,3; après 3 jours : 14,4, et beaucoup d'indican.

Après 4 jours : 18,7; après 5 jours, malgré la grosse quantité d'indican, 3,2 colonies seulement.

Le 6e jour, l'animal meurt, l'analyse de l'urine montrant très peu d'indican.

Lapin n° 21. — Avant l'inanition, une anse avec l'émulsion à 1 p. 1.000, on avait : 2,4 à 6,9 colonies; après 24 heures : 57,2; après 2 jours : 88; après 3 jours : 258, avec beaucoup d'indican; après 5 jours : 427; après 6 jours : 1.015; après 8 jours : 1.560; et enfin, après 9 jours : 3.820 colonies, pour une anse et un tube.

Le 10e jour, l'animal meurt, et, comme presque toujours, peu d'indican dans l'urine.

Ces données nous amènent aux conclusions suivantes :

1° La quantité de *B. coli* viables augmente dans les excréments, aussitôt qu'on met le lapin en état d'inanition;

2° Leur nombre continue à augmenter parallèlement avec la durée de la période d'inanition et avec l'augmentation de l'indican dans l'urine;

3° Parfois, après un jeûne longtemps continué, le nombre de *B. coli* diminue. L'indican disparaît petit à petit et, au moment de la mort, il est même difficile de le constater dans l'urine, prise dans la vessie.

Ici, nous devons ajouter que l'augmentation du nombre du *B. coli* dans la même unité de poids, avant et pendant le jeûne, ne doit pas être mise sur le compte de la consistance des excréments.

Les premiers jours de l'inanition, les excréments du lapin, au point de vue de la consistance, ne diffèrent en rien de ceux qu'on recueille avant le jeûne. Les jours suivants et plus près de la mort, les excréments deviennent secs, et c'est à ce moment-là que nous voyons le nombre de *B. coli* diminuer, ce qui est naturel, car le milieu devient de moins en moins nutritif.

Quant au volume et au poids de la masse contenue dans l'intestin des animaux à jeun, on ne voit pas de différence avec ce qui se passe chez les lapins normaux, à l'exception de l'estomac, où on trouve à la place d'aliments une grosse quantité de mucus. La réaction du contenu intestinal ne diffère pas non plus de celle qu'on a chez les lapins ordinaires.

La grosse quantité de mucus qu'on trouve tout le long du tube digestif des lapins à jeun constitue la seule différence avec le contenu de l'intestin des animaux ordinaires.

A l'autopsie des lapins en état d'inanition, nous n'avons jamais remarqué d'hémorragie, pas plus que d'hyperémie le long de l'intestin.

Le fait de l'accumulation, dans l'intestin des lapins en état

d'inanition, de mucus, riche en peptone, l'augmentation du nombre de *B. coli*, capables de produire beaucoup d'indol dans ce milieu peptoné, l'accroissement parallèle du *B. coli* dans l'intestin et de l'indican dans l'urine, sont autant de circonstances qu'on n'a pas le droit de négliger, quand on discute la question de l'origine de l'indican urinaire chez des animaux en état de jeûne.

Avant d'aborder la recherche quantitative de *B. coli* chez un lapin donné, nous faisions des ensemencements d'essai avec les excréments de ce même lapin. Nous répétions ces ensemencements tous les jours, pour nous assurer que la flore intestinale du lapin qu'on a soumis au régime de carottes était plus ou moins établie. Nous procédions en même temps à la numération du *B. coli*, pour savoir la dilution de l'émulsion à laquelle nous devions nous arrêter. Et ici nous avons assisté à des oscillations du nombre de *B. coli*, surtout prononcées les jours de passage vers le nouveau régime. Ici aussi, le nombre de *B. coli* augmentait beaucoup, mais sans influencer l'indican, car jamais nous n'avons pu le constater dans l'urine. Cette dernière constatation nous fait supposer que ce n'est pas tant l'accroissement seul du nombre de *B. coli* qui influence l'indican; mais qu'en état d'inanition, il doit se développer des races spéciales du *B. coli*, douées de la propriété de produire de l'indol, ou peut-être, que, chez un animal en état d'inanition, sont écartées les conditions qui entravent la production de l'indol chez le lapin nourri avec des carottes exclusivement.

Après avoir étudié 50 colonies du *B. coli* chez un lapin normal et autant chez un lapin en état d'inanition, nous pouvons conclure que, par rapport à la production d'indol, elles sont identiques. Nous avons recherché alors quelles étaient les conditions dans lesquelles vivait le *B. coli*, dans le contenu de l'intestin d'un lapin à jeun et d'un autre qu'on nourrit avec de la carotte.

Le lapin nourri avec de la carotte absorbe une grosse quantité de sucre de 3,05 à 4,5 p. 100 (1) du poids d'aliments. Il se crée dans l'intestin de ce lapin un milieu peptoné + sucre. Il n'y a pas de sucre dans l'intestin de lapin en état de jeûne.

(1) Balland, *Les aliments*. Baillière et fils, 1907, 2 volumes.

D'après les recherches de M. A. Berthelot (1), les sucres introduits avec les aliments, riches en hydrocarbure : carotte, betterave, raisin sec, datte, atteignent en certaine quantité le cæcum du lapin, tandis que, chez le macaque, ces sucres pénètrent dans le cæcum et dans la partie ascendante du côlon en très petite quantité seulement. Dans le contenu de la partie supérieure du gros intestin de lapin, on trouve seulement une petite quantité de sucre, et dans celui du côlon ascendant et descendant du singe, on en trouve des traces. L'auteur a conclu en se basant sur ce fait que, pour faire pénétrer les substances sucrées dans le gros intestin, on peut utiliser certains aliments, parmi lesquels les dattes paraissent être le meilleur, car elles contiennent beaucoup de sucre et peu d'eau.

Après viennent la carotte, la betterave, qui contiennent suffisamment de sucre. Notons que M. Metchnikoff et le Dr Wollman, dans leur dernier mémoire (2) « Sur quelques essais de désintoxication intestinale », en citant ces recherches, déclarent : « Le fait que les lapins, nourris avec de la carotte et de la betterave, produisent des quantités minimes d'indol ou n'en sécrètent pas du tout, s'explique facilement par la pénétration d'une grande quantité de sucre dans le gros intestin, lieu de la putréfaction intestinale. Les conditions chez l'homme et le singe sont sous ce rapport moins favorables. »

Ayant en vue toutes ces considérations, nous avons étudié les processus qui se passent dans l'intestin des lapins nourris de carottes, processus qui empêchent la production de l'indol ou qui en forment si peu qu'il est impossible de déceler dans l'urine l'indoxyl qui en dérive. Il résulte de l'étude de la flore intestinale que le principal producteur d'indol dans l'intestin est le *B. coli*.

Notre attention fut attirée sur les conditions qui empêchent cette bactérie de produire l'indol.

Nous disons que le *B. coli*, en se multipliant dans l'intestin des lapins, nourris avec de la carotte, vit pour ainsi dire dans un milieu peptoné et sucré, tandis que le contenu de l'intestin d'un lapin à l'état de jeûne présente un milieu peptoné mais sans sucre. Escherich avait fait remarquer l'action fermentative du *B. coli* sur le sucre. Plus tard, d'autres chercheurs comme Baginsky, Chantemesse et Widal, Péré Van Ermenghem et Van Ser, Neucké, Grimbert, Tissier et Martel et d'autres ont étudié les fermentations de ces différents sucres par ce microbe.

Il a été établi depuis que, si on ajoute du sucre au milieu

(1) A. Berthelot, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 19 mars 1910.
(2) *Annales de l'Institut Pasteur*, 1912, p. 825.

dans lequel le *B. coli* peut produire de l'indol, ce microbe attaque avant tout ce sucre en formant des acides et que pendant ce temps il ne peut pas produire d'indol aux dépens des substances albuminoïdes qui se trouvent dans le milieu.

De notre côté nous avons entrepris l'étude de l'influence du sucre sur la production d'indol par le *B. coli*. Nous avons cultivé ce microbe dans du bouillon peptoné en y ajoutant 1 p. 100 de sucres variés et nous sommes arrivé à cette conclusion (1) que, quand le *B. coli* vit dans le bouillon peptoné avec 1 p. 100 de variétés de sucres, qui fermentent rapidement, tels que glucose, lévulose, lactose et mannite, il perd sa propriété de produire l'indol. Dans le bouillon, au contraire, auquel on ajoute du maltose ou du saccharose, sucres faiblement fermentés par le *B. coli*, il formera de l'indol d'une façon d'autant plus intense que la fermentation des sucres sera plus faible.

Ne se passe-t-il pas quelque chose d'analogue dans l'intestin du lapin, nourri de carottes riches en sucre? La fermentation de sucres dans l'intestin d'un lapin normal n'entrave-t-elle pas la production d'indol par le *B. coli*? Cet obstacle n'existe pas dans l'intestin des lapins en état d'inanition et c'est pourquoi peut-être le *B. coli* y produit aux dépens des peptones du mucus intestinal une si grande quantité d'indol. Nous n'avons pas l'intention d'identifier la vie du *B. coli* dans le bouillon de culture et dans le contenu de l'intestin; mais, pour expliquer des faits semblables, nous nous sommes permis de faire cette analogie.

On peut nous faire l'objection suivante et nous nous y attendons : Dans le tube au bouillon peptoné et sucré, dans lequel, après pullulation du *B. coli*, on n'a pas pu constater d'indol, il se produit toujours une grosse acidité, ce qu'on ne peut pas observer dans l'intestin du lapin, nourri avec de la carotte ; ne pourrait-on pas considérer cette acidité comme obstacle à la production d'indol par le *B. coli*? A cette objection nous pouvons répondre par les recherches de Péré (2), qui cultivait le *B. coli* sur une couche mince de bouillon peptoné et sucré, bouillon qui était mis au-dessus d'une couche de car-

(1) Rougentzoff, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXXIV, p. 1098.
(2) Péré, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1892, p. 512.

bonate de chaux (qui servait justement à neutraliser l'acidité). Et dans ce milieu neutre il a remarqué un ralentissement dans la production d'indol.

Nous-même, à notre tour, nous avons étudié 20 échantillons de *B. coli*, après des ensemencements dans du bouillon simple, dans du bouillon avec glucose et enfin dans du bouillon glucosé auquel on mélangeait une petite quantité de carbonate de chaux.

On mettait les derniers tubes à l'étuve dans une position inclinée et on obtenait ainsi une couche mince de bouillon sur la couche de carbonate de chaux qui s'était déposée au fond. Nous avons étudié ces tubes au point de vue de l'acidité et de l'indol et nous avons obtenu les résultats suivants :

Nos des colonies.	BOUILLON ORDINAIRE		BOUILLON GLUCOSÉ		BOUILLON GLUCOSÉ + CARBONATE DE CHAUX	
	Acidité.	Indol.	Acidité.	Indol.	Acidité.	Indol.
1	0	× × ×	× × ×	0	0	0
2	0	× × ×	× × ×	0	0	+
3	0	× × ×	× × ×	0	0	0
4	0	× × ×	× × ×	0	0	0
5	0	× × ×	× × ×	0	0	+
6	0	× × ×	× × ×	0	0	0
7	0	× × ×	× × ×	0	0	0
8	0	× × ×	× × ×	0	0	0
9	0	× × ×	× × ×	0	0	0
10	0	× × ×	× × ×	0	0	+
11	0	× × ×	× × ×	0	0	0
12	0	× × ×	× × ×	0	0	0
13	0	× × ×	× × ×	0	0	0
14	0	× × ×	× × ×	0	0	0
15	0	× × ×	× × ×	0	0	0
16	0	× × ×	× × ×	0	0	0
17	0	× × ×	× × ×	0	0	0
18	0	× × ×	× × ×	0	0	0
19	0	× × ×	× × ×	0	0	0
20	0	× × ×	× × ×	0	0	0

Nous pensons que le ralentissement dans la production d'indol est dû, non pas à l'acidité qui se forme dans le tube au

bouillon peptoné et sucré, mais à la modification dans l'alimentation du microbe.

Conclusions.

1° L'étude comparée de la composition qualitative de la flore intestinale des lapins, nourris de carottes, et de ceux qui sont soumis à l'inanition, ne nous donne pas encore l'explication de l'augmentation de l'indican dans l'urine des animaux à jeun.

2° Il se crée peut-être, dans l'intestin des lapins nourris de carottes et grâce à la présence de sucres, des conditions spéciales qui empêcheraient le *B. coli* de produire l'indol.

3° Chez des lapins, au contraire, qui sont soumis à l'inanition et qui sont ainsi privés de sucre alimentaire, le *B. coli* paraît produire de l'indol d'une façon tellement intense qu'on peut constater dans leur urine le dérivé de l'indol, l'indican urinaire.

4° Les sucs digestifs, riches en albumine, doivent contribuer à la formation d'indol dans l'intestin des animaux à jeun.

5° L'augmentation de l'indol et de l'indican urinaire doit dépendre également du nombre toujours croissant de *B. coli* dans l'intestin des animaux en état d'inanition.

6° Toutes nos recherches nous permettent de supposer que l'indican chez des animaux à jeun est bien d'origine intestinale.

En terminant ce travail, nous nous faisons un devoir et un plaisir d'exprimer toute notre reconnaissance à M. le professeur Metchnikoff, pour le sujet qu'il nous a proposé et de l'aide bienveillante avec laquelle il nous a guidé au cours de nos recherches.

Nous adressons aussi nos meilleurs remerciements à M. le Dr Wollman, pour les conseils qu'il a bien voulu nous accorder.

20 septembre 1913.

Le Gérant : G. Masson.

Paris - L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

28e ANNÉE JUILLET 1914 N° 7

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ACTION DE LA TOXINE DIPHTÉRIQUE SUR LE RAT

par Auguste PETTIT.

Suivant une tendance à la généralisation, contre laquelle on ne saurait trop réagir, on incline souvent, malgré les enseignements de la pharmacodynamie, à admettre qu'une substance donnée provoque les mêmes actions sur les animaux les plus divers. En fait, une telle conception ne se vérifie complètement en aucun cas; elle est, d'ailleurs, invraisemblable *a priori*, en raison des différences de constitution chimique qui caractérisent les espèces animales (1).

A ce point de vue, l'exemple de la toxine diphtérique est topique; il suffit, en effet, d'expérimenter sur un petit nombre d'animaux pour constater des variations profondes dans le mode d'action, pour observer un abaissement considérable, parfois même la suppression du pouvoir toxique.

Aussi, peut-on distinguer schématiquement, suivant leur susceptibilité vis-à-vis du poison diphtérique, trois groupes d'animaux :

a) Animaux sensibles, tels que Pigeon, Cobaye, Lapin;

b) Animaux très peu sensibles, tels que Souris, Rat, Hérisson;

c) Animaux réfractaires, tels que Crapaud, Grenouille.

Ainsi, il existe des degrés extrêmement variables dans la toxicité du poison diphtérique pour les diverses espèces animales, et, qui plus est, parmi celles-ci, certaines présentent une immunité plus ou moins complète.

(1) Voir, à ce sujet, les expériences relatives à la réceptivité de deux espèces voisines de Grenouille (*Rana esculenta* et *Rana temporaria*) pour un même Trypanosome. A. Laveran et A. Pettit. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CXLIX, p. 500-502, 1910.

I. — Résistance du Rat a la toxine diphtérique.

Parmi les animaux communément employés dans les laboratoires, le Rat blanc (1) se distingue par sa résistance vis-à-vis de la toxine diphtérique ainsi que l'ont indiqué E. Roux et A. Yersin (1888), puis E. Roux et A. Borrel (1898). Ces constatations ont reçu pleine confirmation des recherches de L. Cobbett (1899), qui s'est attaché, en outre, à préciser la dose à laquelle succombent les Rats : pour tuer un Rat de 75 à 110 gr., l'auteur anglais devait injecter 600 à 700 fois autant de toxine que pour tuer un cobaye de 250 grammes.

Il est bien évident que ces chiffres ne peuvent prétendre qu'à une approximation assez vague, par suite d'une foule de causes, au premier rang desquelles figurent notamment le mode de préparation de la toxine, sa toxicité, la résistance individuelle des sujets d'expérience, etc...

Sous ces réserves, on peut admettre qu'un Rat pesant environ 100 grammes peut impunément recevoir par voie sous-cutanée 1 cent. cube d'une toxine diphtérique, tuant le Cobaye de 250 gr. en 36 heures à la dose de 0,01 cent. cube et en 56 à 60 heures à la dose de 0,0025 cent. cube ; avec 2 cent. cubes, le résultat n'est pas constant, car si la majeure partie des animaux résistent, certains peuvent succomber ; à partir de 3 cent. cubes, la mort est la règle. En d'autres termes, alors que, par injection sous-cutanée, une dose de toxine diphtérique approximativement égale à 1/25.000 du poids somatique détermine la mort du Cobaye et du Lapin en moins de deux jours, il faut dépasser le 1/100 pour obtenir ce résultat chez le Rat blanc.

Toutefois, il est à noter que la répétition des injections est en général assez mal supportée par ce Rongeur et, comme c'est le cas pour nombre de toxines, l'administration renouvelée, à quelques jours d'intervalle, d'une dose inférieure à la dose mortelle détermine de graves désordres et même la mort. On ne peut pratiquer des inoculations successives, sans trop nuire à l'animal, qu'à la condition d'espacer les injections et de n'administrer que des quantités sensiblement inférieures à la dose mortelle ; encore, certains sujets peuvent-ils succomber ainsi qu'il ressort du tableau suivant :

(1) D'après J. Kuprianow, le Rat gris (espèce non précisée) jouirait d'une immunité encore plus marquée.

RATS BLANCS

Nos d'observations.	1	2	3	4	5	6	7	8
—	—	—	—	—	—	—	—	—
Poids en gr. . .	220	150	120	170	130	170	130	150
16 mai.	Injection sous-cutanée de 1 c.c. de toxine diphtérique.							
19 mai.	215	155	115	175	131	168	145 (*)	155
20 mai.	Injection sous-cutanée de 1 c.c. de toxine diphtérique.							
22 mai.	220	150	110	70	130	168	165	159
28 mai.	200	140	(**)	155	110	165	120	140
4 juin	185	155	»	170	130	170	130	155
	Injection sous-cutanée de 0,5 c.c. de toxine diphtérique.							
7 juin.	180	160	»	165	130	175	125	155
13, 18 et 23 juin.	Injection sous-cutanée de 0,5 c.c. de toxine diphtérique.							
26 juin.	190	170	»	160	140	190	135	175
1er juillet	Injection sous-cutanée de 0,5 c.c. de toxine diphtérique.							
4 juillet.	190	180	»	135	170	210	130	170
15 juillet.	Les rats bien portants, 2, 5, 6 et 8, reçoivent seuls, par voie sous-cutanée, 0,5 c.c. de toxine diphtérique.							
23 juillet.	165	170	»	135	170	200	130	170
	2, 5, 6 et 8 reçoivent, par voie sous-cutanée, 0,5 c.c. de toxine diphtérique.							
5 août	160	150	»	135	165	185	118	160

(*) Femelle en gestation ayant avortée.
(**) Le rat no 3 meurt avec lésions nettes du rein, du foie et de la rate.

Les 7 Rats survivants (1) sont mous et paresseux à se mouvoir; ils sont sacrifiés pour servir à d'autres expériences; leur foie est gras et nécrosé par places.

Le mode d'administration joue, d'ailleurs, un rôle important au point de vue du pouvoir toxique et cette action se manifeste beaucoup plus énergiquement lorsqu'on substitue à la voie sous-cutanée les voies intravasculaire ou intracœlomique, ou surtout intracérébrale. Dans ce dernier cas, ainsi que l'ont montré E. Roux et A. Borrel, une dose de 0,1 cent. cube est souvent suffisante pour entraîner la mort d'un Rat adulte, ce qui semble bien indiquer que le cerveau de ce Rongeur est sensible à la toxine. Aussi, ces savants n'hésitent pas à conclure que « l'immunité du Rat vis-à-vis du poison diphtérique ne tient point à une résistance des cellules nerveuses »... On ne saurait davantage attribuer cet état réfractaire à des propriétés antitoxiques du sang ni des tissus. En effet, J. Kuprianow a montré, dès 1894, que les macérations d'organes de Rat neuf injectées au Cobaye n'influencent pas l'action des cultures de Bacille diphtérique et que le sérum sanguin n'agit pas non plus sur les cultures vivantes de diphtérie.

Le dosage du pouvoir antitoxique du sérum chez le Rat blanc neuf corrobore ces résultats : évaluée d'après la méthode de

(1) Chez nombre de Rats, j'ai observé l'alopécie étudiée par H. M. Goodman.

P. Ehrlich, cette teneur n'atteint pas 0,25 d'I. E. par cent. cube; on ne peut donc vraisemblablement songer à lui attribuer un rôle dans l'immunité relative dont jouit naturellement le Rat.

A ce point de vue, il est à noter que la sensibilité des espèces zoologiques n'est pas toujours en rapport avec le pouvoir protecteur du sérum; c'est tout au moins ce qui semble résulter de l'examen comparatif du Pigeon, du Cobaye, du Lapin et du Rat; ce sont là, en effet, quatre animaux chez lesquels le pouvoir antitoxique du sérum est pratiquement nul (1), mais dont la résistance varie dans de larges limites : pour tuer sûrement le Rat, il faut lui administrer par voie sous-cutanée plus de 100 fois la dose mortelle pour le Pigeon et le Cobaye.

En raison de son état réfractaire vis-à-vis de la toxine, le Rat se distingue donc parmi les divers Mammifères étudiés jusqu'à ce jour, et, à s'en rapporter aux expériences de A. Strubell, il résiste, toutes choses égales d'ailleurs, à des doses plus élevées que le Hérisson (2).

II. — Réactions tissulaires consécutives a l'injection de toxine diphtérique chez le Lapin et chez le Rat.

Après avoir examiné la résistance générale du Rat vis-à-vis de la toxine diphtérique, il convient de compléter cette première indication par l'étude comparative des viscères chez ce Rongeur et chez un animal sensible, le Lapin par exemple, dont l'étude a fait l'objet de nombreuses recherches.

(1) Le sérum du Pigeon ne titre pas 0,25 d'I. E. par cent. cube; ceux du Cobaye et du Lapin, pas 0,5 d'I. E. par cent. cube.

(2) Voici quelques résultats empruntés à A. Strubell :

POIDS du Hérisson.	DOSE INJECTÉE par voie sous-cutanée en cent. cubes.	RÉSULTATS
700 grammes.	0,5	Mort en 10 jours.
750 grammes.		
1.000 grammes.	2 »	Mort en 7 jours et demi.
1.100 grammes.	4 »	Mort en 9 jours et demi.
750 grammes.	6 »	Mort en 4 jours et demi.
700 grammes.	4 »	Mort en 6 jours et demi.
800 grammes.	8 »	Mort en 4 jours et demi.
950 grammes.	0,3	Survit.
650 grammes.	0,1	Survit.

Comme E. Roux et A. Yersin l'ont indiqué dès 1888, les lésions dominantes chez le Lapin siègent au niveau du foie (fig. 1). Une proportion de cellules, en général élevée, souvent même la presque totalité, est atteinte : le cytoplasma présente de la dégénérescence granulo-graisseuse et les noyaux sont le siège de phénomènes extrêmement accusés de pyknose et surtout de karyorrhexis.

Les lésions du rein ne sont guère moins graves ; le segment à bordure en brosse est nécrosé; en nombre de points, les tubes se desquament, à des degrés divers de leur revêtement épithélial ; la lumière canaliculaire s'obstrue ainsi de débris cellulaires plus ou moins altérés; dans certains cas, les

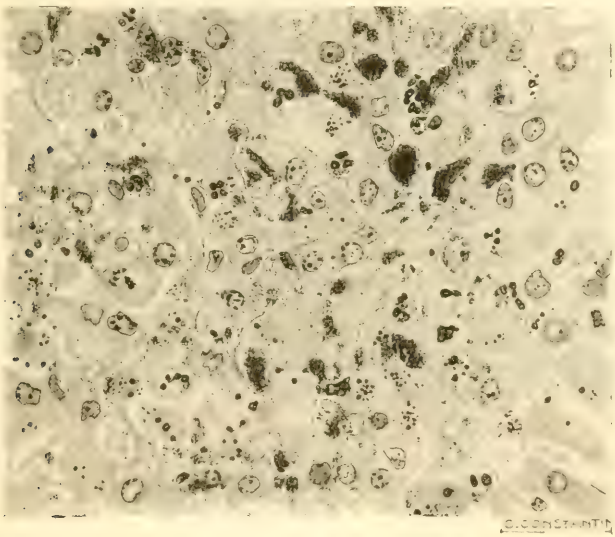


Fig. 1. — Coupe de foie de Lapin ayant succombé à l'injection intraveineuse de 0,05 gr. de culture de Bacilles diphtériques. Nécrose de coagulation, pyknose et karyorrhexis.

cellules sont encore parfaitement reconnaissables, mais, en général, il s'agit d'un magma granuleux parsemé de débris nucléaires; enfin, on notera l'intensité des lésions qui frappent les tubes droits : fréquemment ceux-ci se présentent comme des canaux complètement dépourvus de revêtement épithélial et obstrués par un bouchon granuleux, riche en particules basophiles.

La surrénale est congestionnée et profondément altérée.

Quant à la rate, en particulier dans le cas où la toxine est injectée dans l'épaisseur du parenchyme, sa structure est bouleversée; la majeure partie des cellules propres a disparu et les corpuscules de Malpighi sont presque complètement détruits; en nombre de points, le parenchyme est réduit à une bouillie formée d'hématies, de leucocytes et surtout de débris cellulaires (fig. 2), parmi lesquels on ne distingue guère que des fragments nucléaires (pyknose et karyorrhexis).

Au niveau du système nerveux, les altérations les plus manifestes consistent en de la pyknose (1).

Chez le Rat, il en va tout autrement : un animal pesant 100 grammes peut recevoir, par voie sous-cutanée, une dose de toxine diphtérique 10 fois supérieure à la dose mortelle pour

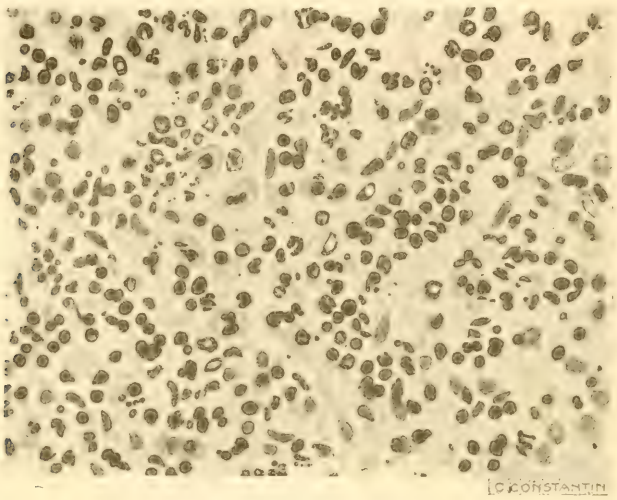


Fig. 2. — Coupe de rate de Lapin ayant succombé à l'injection sous-cutanée de 0,1 cent. cube de toxine diphtérique. Pyknose et karyorrhexis.

le Lapin, sans que, dans la majorité des cas, on constate de lésions histologiques manifestes au niveau de la rate, de la surrénale, du cerveau, du foie ni du rein. Certains sujets présentent bien des modifications cellulaires, mais il s'agit de lésions

(1) De nombreuses recherches (Oertel, Hanot, Bulloch et Schmorl, Barbacci, Babes, Welch et Flexner, Dubief et Brühl, Bezançon, Baldassari, etc...) ont, depuis longtemps, mis en évidence l'importance des altérations nucléaires dans l'intoxication diphtérique ; d'après les descriptions de ces auteurs, ces modifications consistent essentiellement en des phénomènes de pyknose et de karyorrhexis. Certaines lésions nucléaires, cependant, ne rentrent pas dans ce cadre; c'est le cas, notamment, des noyaux des leucocytes polymorphes chez le Lapin.

Indépendamment des phénomènes bien connus de pyknose et de karyorrhexis, on observe dans les leucocytes à noyaux polymorphes un autre processus dégénératif, caractérisé par une inversion des affinités chromatiques ; les lobes nucléaires sont plus nettement distincts qu'à l'état normal et leurs réactions sont complètement modifiées; ils ont perdu la faculté de

légères (1), dont l'intensité n'est en aucune façon comparable à celle des altérations qui siègent au niveau des organes des animaux sensibles ou du Rat ayant reçu une dose mortelle.

Parmi ces modifications, notons, entre autres, une hypertrophie manifeste du noyau des tubes contournés du rein ; son volume dépasse fréquemment le double des dimensions normales ; il est irrégulier et renferme de très nombreux et très fins grains de chromatine, ainsi qu'un ou plusieurs nucléoles ; il affecte ainsi un aspect de noyau de cellule néoplasique qui tranche sur celui des éléments normaux (fig. 3). Cette hypertrophie s'observe surtout chez les Rats et les Souris sacrifiés 24 heures après l'injection sous-cutanée d'une dose de toxine variant entre 0,5 à 1,5 p. 100 du poids somatique ; elle fait défaut, en général, chez les animaux qui succombent à l'intoxication diphtérique avec des lésions cellulaires graves.

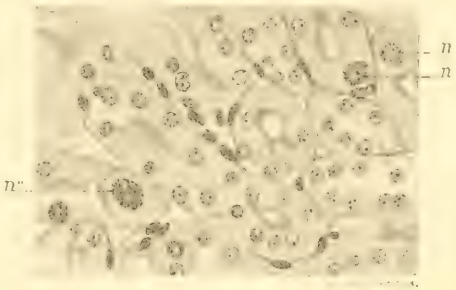


Fig. 3. — Coupe de rein de Rat. Noyaux hypertrophiés consécutivement à l'injection sous-cutanée de 0,5 cent. cube de toxine diphtérique ; n, n', n'', noyaux hypertrophiés.

Avec des doses plus élevées de toxine diphtérique, et, notamment, dans le cas de doses mortelles ou inframortelles répétées, la plupart des viscères du Rat offrent des

fixer les couleurs basiques usuelles pour prendre la teinture acide (fig. 4). Il est à noter qu'on ne saurait attribuer cette modification à un artifice de préparation ; en effet, on la retrouve invariablement sur toutes les préparations, alors que les noyaux normaux ou pyknotiques ne cessent d'être basophiles.

D'autre part, cette lésion présente ce caractère très particulier de n'être pas influencée par le sérum antidiphtérique : chez le Lapin qui a reçu 1 à 2 cent. cubes de sérum antidiphtérique 24 heures avant l'injection de 0,1 cent. cube de toxine diphtérique, les lésions sont très minimes ; elles se bornent à des phénomènes peu accusés de pyknose et de karyorrhexis, notamment au niveau des organes hémolymphatiques ; mais, l'action protectrice du sérum ne s'étend pas à tous les éléments : l'altération nucléaire, que rend manifeste l'inversion des affinités chromatiques, persiste, en effet, dans nombre de leucocytes à noyaux polymorphes (fig. 4).

(1) Il faut tenir compte aussi du fait que le bouillon, qui sert de véhicule à la toxine, n'est pas sans action sur l'organisme du Rat.

lésions rappelant, par leurs traits essentiels, celles réalisées chez le Lapin. Toutefois, l'ordre d'intensité des altérations qui frappent les divers parenchymes est modifié ; on retrouve entre le Lapin et le Rat des différences analogues à celles que signalaient naguère E. Roux et A. Yersin entre le Lapin et le Cobaye : « Il est remarquable que la pleurésie, qui est la règle chez le Cobaye après l'inoculation de la diphtérie, ne se rencontre que rarement chez le Lapin ; au contraire, la dégénérescence du foie, qui est fréquente chez le Lapin, manque chez le Cobaye. »

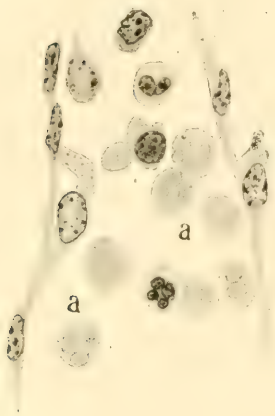


Fig. 4. — Capillaire de la rate de Lapin, ayant reçu préventivement du sérum antidiphtérique, puis de la toxine diphtérique. Le noyau d'un certain nombre de leucocytes est devenu acidophile, *a*.

Chez le Rat qui succombe à l'administration de toxine diphtérique, au premier rang des organes lésés figurent d'abord le rein (fig. 5), puis le foie (fig. 6) et la rate (fig. 7). Dans certains cas, le parenchyme rénal présente des lésions d'une intensité très grande (fig. 5) : la plupart des tubes des divers segments renferment des débris cellulaires plus ou moins nécrosés, parfois agglomérés en cylindres compacts. En second lieu, on observe un certain degré de nécrose de coagulation, surtout accusée au niveau du segment à bordure en brosse ; cette dégénérescence s'accompagne de pyknose ; dans ce dernier cas, ces processus aboutissent souvent à la destruction presque complète de l'épithélium de revêtement. Notons, enfin, une congestion vasculaire intense.

Au niveau du foie (fig. 6), les modifications les plus marquées consistent en de la congestion vasculaire manifeste dans la zone centrale du lobule et en de l'atrophie des cordons de Remak. Comme chez le Lapin, il existe de la nécrose de coagulation et de la pyknose, mais celles-ci y sont infiniment moins accusées et il n'y a pas de karyorrhexis manifeste.

Les lésions spléniques (fig. 7) sont caractérisées par un cer-

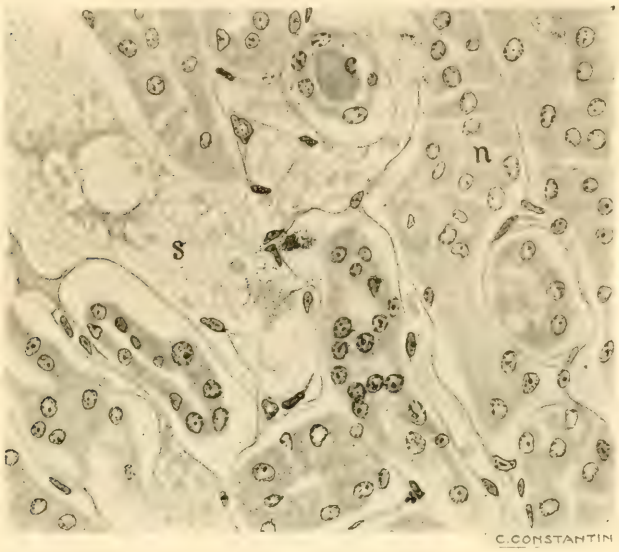


Fig. 5. — Coupe de rein de Rat ayant succombé à l'injection sous-cutanée de 3 cent. cubes de toxine diphtérique. Un certain nombre de tubes sont détruits et leur emplacement occupé par du sang, *s*; d'autres renferment des cylindres denses, *c*; beaucoup ont subi la nécrose de coagulation, *n*.

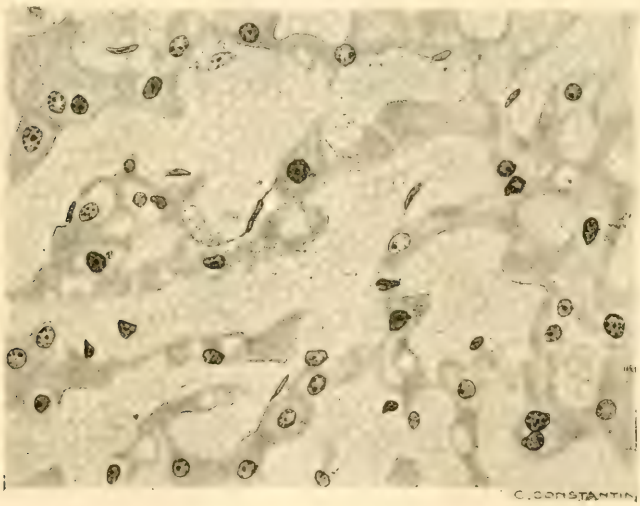


Fig. 6. — Coupe de foie de Rat ayant succombé à l'injection intracérébrale de 0,5 cent. cube de toxine diphtérique. Nécrose de coagulation, congestion intense, destruction partielle des cordons de Rémak, début de pyknose.

tain degré d'homogénéisation du parenchyme ainsi que par des phénomènes de pyknose et de karyorrhexis.

En somme, dès que la quantité de toxine introduite dans l'organisme atteint une certaine limite, les éléments anatomiques du Rat réagissent vis-à-vis de ce poison à la façon de ceux d'un animal sensible. Les altérations les plus profondes siègent au niveau du rein, et on ne retrouve ni la dégénérescence hépatique du Lapin ni la congestion hémorragique surrénale du Cobaye. Ainsi, la façon dont se comportent les divers

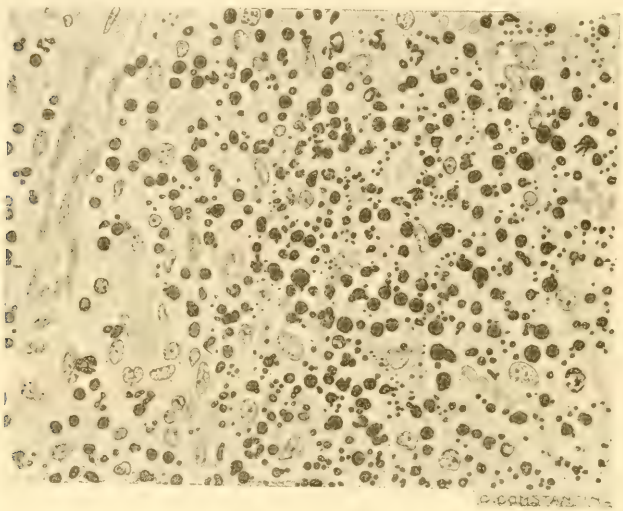


Fig. 7. — Coupe de rate de Rat ayant succombé à l'injection sous-cutanée de 3 cent. cubes de toxine diphtérique. Pyknose et karyorrhexis.

parenchymes organiques varie sensiblement suivant les espèces zoologiques et, pour chacune de celles-ci, il y a une hiérarchie dans les organes au point de vue de la gravité des lésions cellulaires.

III. — Persistance de la toxine dans l'organisme.

Les observations précédentes concordent pour montrer que l'immunité relative du Rat vis-à-vis de la toxine diphtérique est en rapport avec la résistance à la dislocation des éléments anatomiques. A l'appui de cette conception, on peut faire valoir

les expériences du genre de celle-ci : un Rat est anesthésié ; puis, avec les précautions habituelles d'asepsie, on met à nu la rate et on injecte dans l'épaisseur du parenchyme 0,2 à 0,4 cent. cube de toxine diphtérique ; ceci fait, on suture la paroi et on abandonne l'animal à lui-même pendant vingt-quatre à quarante-huit heures ; au bout de ce temps, l'animal est sacrifié, la rate fixée, puis étudiée suivant les méthodes histologiques usuelles ; alors que, chez le Lapin traité de cette façon, une portion plus ou moins étendue du parenchyme splénique serait complètement détruite, chez le Rat, au contraire, les cellules demeurent à peu près inchangées et les lésions se bornent à des troubles circulatoires et à quelques infarctus.

Il est à remarquer d'ailleurs que les injections sous-cutanées de toxine reproduisent, au point de vue du mode d'action sur les cellules de l'organisme, des conditions assez comparables à l'inoculation intraparenchymateuse.

En effet, injectons, par voie sous-cutanée, 1 à 2 cent. cubes de toxine diphtérique à un Rat adulte ; recueillons son urine et inoculons 3 à 5 cent. cubes de celle-ci, après l'avoir filtrée sur bougie, à un Cobaye de 250 grammes ; lorsque les urines ont été émises de quelques heures à un — trois jours après l'inoculation, le Cobaye succombe (1) avec les lésions caractéristiques de l'empoisonnement diphtérique (exsudats pleural et cœlomique, congestion pulmonaire, hémorragie surrénale, etc...) ; lorsque la survie est suffisante, une escarre apparaît au point d'inoculation. Mais, il suffit d'administrer préventivement au Cobaye 1 à 2 cent. cubes de sérum antidiphtérique ou encore d'additionner l'urine d'une quantité égale de ce même sérum pour empêcher l'apparition de ces divers phénomènes. Ainsi, de la toxine diphtérique traverse l'organisme du Rat, en conservant intactes ses propriétés essentielles, après avoir baigné les cellules de l'organisme.

IV. — L'immunité cellulaire.

On est donc amené à conclure, avec A. Calmette et A. Deléarde, dans leurs recherches sur les venins, que « ...l'état

(1) L. Cobbett n'a observé qu'une fois la mort de l'animal.

d'immunité naturelle à l'égard des toxines n'implique nullement l'existence, dans le sang des animaux réfractaires, de substances antitoxiques spécifiques et que ces substances, lorsqu'elles existent, ne sont jamais assez actives pour expliquer l'immunité relativement solide dont jouissent ces animaux »

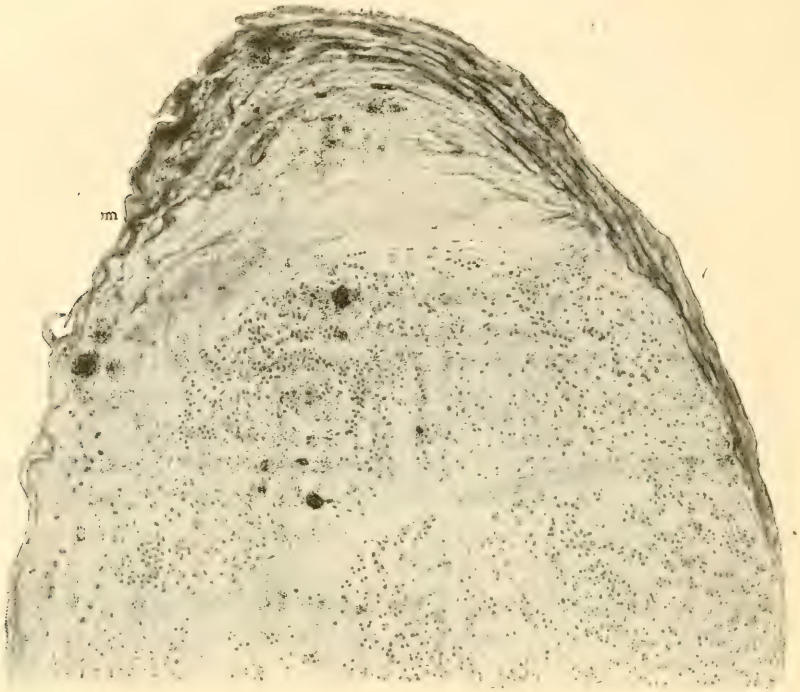


Fig. 8. — Coupe de rate de Rat. Fausse membrane *m*, développée consécutivement à l'injection intrasplénique de toxine diphtérique.

et que celle-ci est en rapport avec une résistance cellulaire, constatable morphologiquement.

En somme, les cellules du Rat se comportent d'une façon comparable à celles des organismes monocellulaires, mises en contact avec les toxines. Chez ceux-ci, comme l'a montré O. Gengou, il ne se produit pas de lésions, bien qu'il ne puisse être question ni d'un pouvoir antitoxique du sang ni d'une élimination rapide des toxines injectées, puisque ces organismes se meuvent dans le milieu toxique et sont, par conséquent, tou-

jours en contact avec celui-ci. La seule explication plausible est qu'il s'agit de l'immunité histogène de Behring (ou cytologique de L. Camus et E. Gley).

Il est très vraisemblable, d'ailleurs, qu'il existe des degrés dans cette immunité relative des éléments anatomiques des divers organes (1); en tout cas, on peut observer une discordance dans les effets de la toxine diphtérique; c'est ainsi qu'une injection intrasplénique de toxine, incapable d'entraîner la mort, ou même simplement des altérations manifestes, peut cependant provoquer, dans quelques cas, la formation de fausses membranes fibrineuses à la surface de la rate (fig. 8).

En résumé, le Rat présente vis-à-vis de la toxine diphtérique un état réfractaire assez marqué, supérieur à celui de la plupart des autres mammifères; en dehors des réactions leucocytaires et des propriétés du sérum auxquelles on attribue généralement la prééminence dans les phénomènes d'immunité naturelle, il convient donc, dans le cas de ce Rongeur, d'attribuer un rôle important à la résistance propre des éléments anatomiques de l'organisme (2).

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

Behring (E.). — Article « Immunität ». *Eulenburg's Real-Encyclopädie der ges. Heilkunde*, t. XI, p. 451-456, Wien et Leipzig, 1896.

Calmette (A.) et Deléarde (A.). — Sur les toxines non microbiennes et le mécanisme de l'immunité par les sérums antitoxiques. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. X, p. 675-708, 1896.

Camus (L.) et Gley (E.). — *Recherches sur l'action physiologique des ichthyotoxines*, p. 106-108. 1 vol. in-8°, 233 pages. Paris, Masson et Cie, 1912.

Chantemesse (A.) et Podwyssotsky (A.). — *Les processus généraux*, t. Ier, 1 vol. in-8°, 428 pages. Paris, Naud, 1901 (p. 386, Dissolution de la chromatine des noyaux).

(1) D'après les recherches de L. Camus et E. Gley, la Marmotte réalise à ce point de vue un exemple intéressant; quoique très sensible à l'action générale du sérum d'Anguille, ses hématies cependant ne sont point hémolysées par ce liquide.

(2) Rappelons l'hypothèse émise par H. M. Goodman. D'après cet auteur, l'immunité du Rat serait due à ce que ses cellules se répartiraient en trois catégories dont les récepteurs posséderaient à des degrés divers ou ne posséderaient pas la faculté de s'unir avec la toxine diphtérique.

Cobbett (L.). — The Resistance of Rats to Diphtheria Toxin. *The british medical Journal*, I, p. 902-903, 1899.

Cobbett (L.). — Excretion of Diphtheria Toxin in the Urine. *The british medical Journal*, t. II, p. 21, 1900.

Dean (G.). — Types of Immunity. The Toxin of the Diphtheria Bacillus. *In* Nuttall (G. H. F.) and Graham Smith (G. S.), *The Bacteriology of Diphtheria*, p. 449-500, 1 vol. in-4°, Cambridge, 1908.

Gengou (O.). — Sur l'immunité naturelle des organismes cellulaires contre les toxines. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XII, p. 465-470, 1898.

Goodman (H. M.). — Observations on natural Immunity and Susceptibility to Diphteria Toxin. *The Journal of infectious Diseases*, t. IV, p. 509-540, 1907.

Kuprianow (J.). — Experimentelle Beiträge zur Frage der Immunität bei Diphterie. *Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde*, t. XVI, p. 415-434, 1894.

Mallory (F. B.). — The Pathology of Diphtheria. *In* Nuttall (G. H. F.) and Graham-Smith (G. S.), *The Bacteriology of Diphtheria*, p. 82-121, 1 vol. in-4°, Cambridge, 1908.

Pettit (Auguste). — Action de la toxine diphtérique sur le Rat. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXXIV, p. 1198-1200, 1913.

Roux (E.) et Borrel (A.). — Tétanos cérébral et immunité contre le tétanos. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XII, p. 225-239, 1898.

Roux (E.) et Yersin (A.). — Contribution à l'étude de la diphtérie. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. II, p. 629-661, 1888.

Strubell (A.). — Die Immunität des Igels gegen Toxine, seine Festigkeit gegenüber banalen Giften. *Centralblatt für Bakteriologie*, Orig., t. LIII, p. 43-57, 1910.

ÉTUDE MORPHOLOGIQUE ET BIOLOGIQUE SUR « TRYPANOSOMA PECAUDI »

par OGAWA.

(Travail du Laboratoire de M. Mesnil, à l'Institut Pasteur.)

Au cours de l'infection par le *Trypanosoma pecaudi*, virus de la Baléri, chez les animaux, le parasite se présente sous deux formes différentes, l'une longue et effilée, l'autre courte et trapue. Au début des recherches sur la Baléri, Pécaud était incliné à croire qu'il s'agissait bien, au point de vue morphologique, d'une infection double due à deux trypanosomes d'espèces différentes, mais il n'a jamais pu appuyer son hypothèse sur des preuves. Dans ses nombreuses expériences, Laveran n'a pas réussi non plus à séparer les deux formes.

Il était donc intéressant de rechercher le rapport existant entre l'allure de l'infection et l'apparition des deux formes dans le sang des animaux en expérience, et de se demander si ces deux formes, si différentes morphologiquement, le sont aussi par leurs caractères dans certaines conditions expérimentales. Il était bon aussi de donner, de ce *Trypan. pecaudi*, si souvent rapproché d'espèces pathogènes de l'Afrique orientale ou du Congo central, une étude biométrique comparable à celle auxquels ont été soumis les trypanosomes en question. Nous avons dans ce double but entrepris, sur les conseils de M. le professeur Mesnil, l'étude morphologique et biologique de ce trypanosome.

Pour cela, nous avons employé des cobayes et des souris infectés avec un virus rapporté du Dahomey par le Dr Bouet; il existait au laboratoire de M. Mesnil depuis 1908; il y était conservé sur cobayes.

Nous résumons les observations de 15 cobayes et 10 souris dans les tableaux suivants :

TABLEAU I. — **Observations sur les cobayes.**

Nos	POIDS (gr.).	INOCULATION	DURÉE de l'incubation (jours).	CRISE	DURÉE TOTALE de l'infection (jours).
99	480	Sous-cutanée.	5	»	22
100	332	Id.	5	»	13
11	625	Id.	4	»	8
76	440	Id.	3	Du 9e au 11e jour.	17
77	380	Id.	4	»	20
14	700	Intrapéritonéale.	2	»	21
15	385	Sous-cutanée.	2	Du 5e au 7e jour.	14
18	495	Intrapéritonéale.	4	»	8
21	750	Sous-cutanée.	2	10e jour.	14
19	420	Id.	6	»	15
20	410	Id.	5	Du 12e au 18e jour.	22
22	620	Id.	5	»	15
23	570	Id.	3	Du 10e au 11e jour.	16
215	455	Id.	5	Du 11e au 12e jour.	24
209	357	Id.	6	Du 11e au 12e jour.	20

TABLEAU II. — **Observations sur les souris.**

Nos	POIDS (gr.).	INOCULATION	DURÉE de l'incubation (jours).	DURÉE TOTALE de l'infection (jours.)
1.	16	Sous-cutanée.	2	5
2.	13	Id.	2	6
3.	16	Id.	2	5
4.	14	Id.	2	5
5.	20	Id.	2	5
6.	16	Id.	1	5
7.	12	Id.	1	4
8.	25	Id.	4	15
9.	18	Id.	2	5
10.	13	Intrapéritonéale.	1	7

L'infection chez les animaux en expérience s'est toujours terminée par la mort. Chez les cobayes, la durée moyenne de la maladie a été de 16 jours, au maximum de 24 jours, au minimum de 8 jours. L'incubation a duré de 2 à 6 jours. Les 7 cobayes ont été atteints de crise le 5e jour au plus tôt, le 12e jour au plus tard, et la crise a duré de 1 à 3 jours.

Chez les souris, la maladie a affecté une forme plus rapide que chez les cobayes. La durée moyenne a été de 6 jours, au maximum de 15 jours, au minimum de 4 jours. Il n'y a jamais eu de crise. L'incubation n'a duré que 2 jours en général. Une

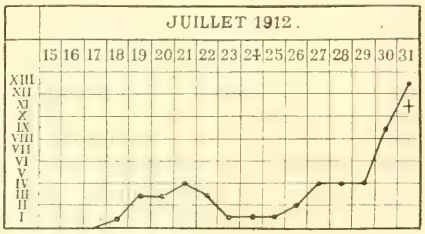
seule souris de 25 grammes a présenté une incubation de 4 jours. En revanche, chez 3 souris, l'apparition des trypanosomes dans le sang a eu lieu dès le lendemain de l'inoculation.

Au début de l'infection, à l'examen microscopique du sang pris à l'oreille des cobayes et à la queue des souris, les trypanosomes étaient extrêmement rares. Les parasites, dès leur apparition dans le sang, se sont multipliés constamment, excepté pendant la période de crise, quand elle a existé. En cas de crise, ils diminuaient notablement ou disparaissaient tout à fait. Dans tous les cas, on a constaté, dans la dernière période de l'infection, une augmentation considérable du nombre des parasites.

Les courbes suivantes donnent des exemples du nombre des parasites au cours de l'infection. Ces trypanosomes ont été examinés dans les préparations fixées et colorées.

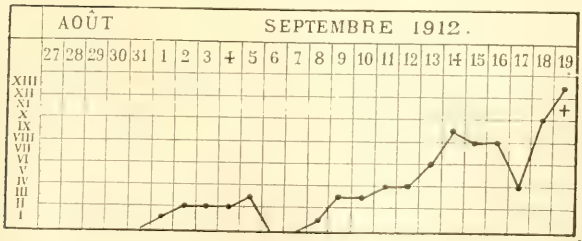
La ligne verticale représente le nombre moyen de trypanosomes par champ (Leitz, oculaire compensateur 8, objectif, immersion 8 millimètres, longueur du tube 152 millimètres), la ligne horizontale les jours de l'infection.

Nombre moyen des Trypanosomes par champ	
0,1 à 1	I
0,1 à 10	II
11 à 20	III
21 à 30	IV
31 à 40	V
41 à 50	VI
51 à 60	VII
61 à 70	VIII
71 à 80	IX
81 à 90	X
91 à 100	XI
101 à 200	XII
au dessus de 200	XIII



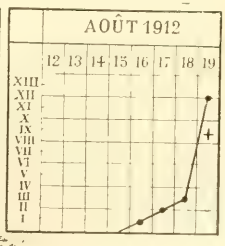
Courbe 1.

Tracé des parasites chez le cobaye 76, inoculé le 15 juillet 1912.



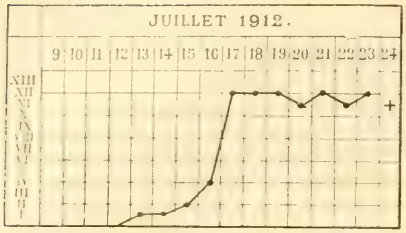
Courbe 2.

Tracé des parasites chez le cobaye 215, inoculé le 27 avril 1912.

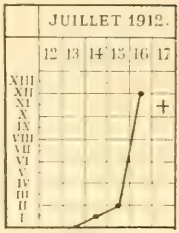


Courbe 3.

Tr. chez cob. 18, inoc. 12 avr. 1912.



Courbe 4.



Courbe 5.

Tracé des parasites chez la souris
n° 8, inoculée le 9 juillet 1912. n° 9, inoculée le 12 juillet 1912.

Morphologie.

Les deux formes, longues-effilées et courtes-trapues, se sont présentées chez tous les animaux en expérience. A l'état frais, entre lame et lamelle, les trypanosomes se montrent d'une grande mobilité, tantôt s'agitant sur place, tantôt s'avançant avec rapidité. On peut facilement se rendre compte que les formes longues, munies d'un flagelle libre, sont généralement plus vives que les formes courtes-trapues.

Dans les frottis de sang fixé aux vapeurs osmiques (solution aqueuse à 2 p. 100) à l'état humide quinze secondes et coloré au Giemsa, on distingue très nettement les deux formes. Les unes ont le corps protoplasmique long et mince avec un flagelle dont la partie libre est assez longue, et avec l'extrémité postérieure plus ou moins effilée. Les autres sont courtes et larges avec l'extrémité postérieure mousse ou en tronc de cône ; le protoplasma se prolonge jusqu'à l'extrémité antérieure comme chez le *Trypanosoma dimorphon*. La membrane ondulante est assez développée, mais peu plissée ; elle est plus large chez les formes courtes que chez les formes longues.

Vers le milieu du corps, on trouve un noyau compact ; il est plus ou moins allongé dans le sens de l'axe du corps dans les formes longues, et arrondi dans les formes courtes. Le blépharoplaste sphérique, parfois ovalaire, est placé, dans les formes longues, à 2 ou 3 μ environ de l'extrémité postérieure, tandis qu'il est situé, dans les formes courtes, tout près de l'extrémité postérieure.

Dans le protoplasme teinté en bleu, on distingue parfois, prin-

cipalement dans la moitié antérieure, des granulations plus ou moins grosses qui se colorent en rouge foncé. Dans les formes courtes, on voit souvent une vacuole ronde située près du blépharoplaste.

Dans l'étude morphologique du *Trypanosoma rhodesiense*, Stephens et Fantham ont décrit, chez les rats infectés, une forme particulière dont le noyau est situé tout près de l'extrémité postérieure. Récemment, Yorke et Blacklock ont observé la même forme également chez le *Trypanosoma equiperdum*.

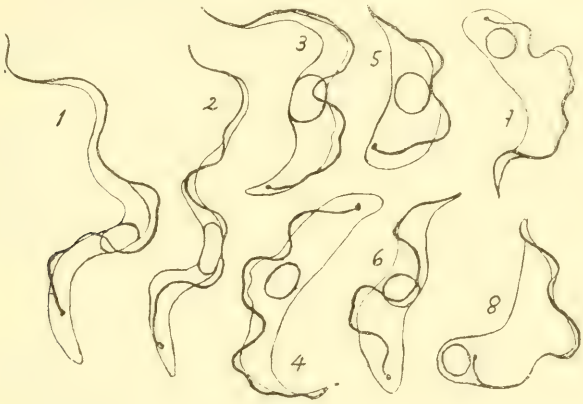


Fig. 1 et 2, Formes longues; 3 et 4, Formes intermédiaires; 5 à 8, Formes courbes.

Parmi les formes courtes et trapues du *Trypanosoma pecaudi* dans le sang des cobayes et des souris infectés, nous avons noté aussi, à la suite de Wenyon, Laveran et Nattan-Larrier, des individus avec le noyau situé près de l'extrémité postérieure (à une distance variable) ou même rarement en arrière du blépharoplaste (1 fois sur 823 trypanosomes examinés dans une préparation de sang de cobaye infecté).

En outre, on voit souvent des formes intermédiaires munies d'un flagelle court.

Les dimensions des trypanosomes en μ sont les suivantes :

Formes longues-effilées . . .	24 à 34	μ de long.
	1 à 3,5	μ de large.
Formes courtes-trapues . . .	12 à 30	μ de long,
	2,5 à 4	μ de large.
Formes intermédiaires. . . .	21 à 23	μ de long,
	1,5 à 2	μ de large.

Quant à la structure du protoplasme et du noyau des deux formes du *Trypanosoma pecaudi*, on ne peut y trouver de différences en ce qui concerne la sexualité.

Apparition des deux formes dans le sang des animaux infectés.

Au cours de l'infection, on peut constater une proportion remarquable entre le nombre des formes longues et celui des formes courtes. Les formes longues et les formes de division apparaissaient d'abord dans le sang. Les formes courtes se présentaient seulement quelques jours après l'apparition des premières formes.

Quand la maladie durait assez longtemps (c'était le cas presque toujours pour les cobayes), dès la période moyenne, les formes courtes se présentaient en nombre notable. Puis, dans la dernière période de l'infection, c'étaient de nouveau les formes longues qui dominaient. Laveran a noté des variations semblables chez les rats infectés.

Chez les animaux qui succombaient rapidement (c'était le cas presque toujours pour les souris), les formes longues étaient en nombre bien supérieur à celui des autres pendant tout le cours de l'infection.

Tableau. III. — **Nombres des trypanosomes considérés dans leurs**

Jour de l'infection.	Longueurs en μ																				
	12	12.5	13	13.5	14	14,5	15	15,5	16	16,5	17	17.5	18	18.5	19	19.5	20	20.5	21	21.5	22
6e	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	3
7e	0	0	0	0	0	0	2	1	0	1	5	2	0	0	1	2	3	2	2	1	7
8e	1	0	3	1	2	5	0	2	2	0	1	2	3	1	4	1	4	4	9	5	6
9e	2	4	4	5	6	5	9	10	6	5	4	0	3	3	4	0	2	1	4	3	4
10e	5	2	2	6	6	7	4	6	3	5	0	4	1	1	2	2	8	2	1	2	3
11e	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	3	1	2	2	3	4	1
12e	0	0	0	0	0	1	1	0	1	3	1	1	0	4	1	2	4	1	3	1	2
13e	0	0	1	0	2	0	0	1	1	1	1	2	2	3	2	6	4	3	6	3	10
14e	0	1	1	1	0	0	1	1	2	0	2	2	1	2	3	6	4	1	1	2	3
15e	1	0	0	1	0	1	4	5	1	3	4	5	3	1	5	1	1	2	3	1	3
Totaux :	9	7	12	14	17	19	21	26	16	20	18	19	13	16	25	21	33	18	33	22	42
P. 100.	0,9	0,7	1,2	1,4	1,7	1,9	2,1	2,6	1,6	2,0	1,8	1,9	1,3	1,6	2,5	2,1	3,3	1,8	3,3	2,2	4,2

L'étude biométrique met bien en évidence les faits que nous venons de décrire (tableaux III, IV, V, VI). Il en résulte clairement que le tableau des parasites diffère notablement suivant le jour de l'infection et l'espèce animale.

Les trypanosomes (dans les préparations fixées à l'état humide aux vapeurs osmiques et colorées au Giemsa) ont été projetés à un grossissement de 2.000 diamètres à l'aide de la chambre claire et mesurés avec un curvimètre d'un millimètre d'entredent (1/2 μ par conséquent). La longueur a été prise dans l'axe du corps, de l'extrémité postérieure au bout du flagelle libre. Nous avons absolument négligé les formes de division. 100 trypanosomes par jour d'infection, chez 2 cobayes (nos 18 et 76) et 2 souris (nos 8 et 9), au total, 2.500 trypanosomes, ont été examinés.

Cobaye n° 76, du poids de 440 grammes, est inoculé avec le *Trypanosoma pecaudi* le 15 juillet 1912.

L'inoculation est faite sous la peau avec le sang d'un cobaye fortement infecté. Le 18 juillet, à l'examen microscopique du sang pris à l'oreille, les trypanosomes sont extrêmement rares. Les parasites, dès leur apparition, se multiplient constamment. Cependant, ils diminuent notablement du 23 au 25 juillet. Le 31 juillet, l'animal meurt. On a constaté, à la dernière période de l'infection, une augmentation considérable du nombre des parasites. (Voir courbe 1, p. 679.)

Cobaye n° 18, du poids de 495 grammes, est inoculé dans le péritoine, le

longueurs, chez le cobaye n° 76, du 20 au 29 juillet 1912.

LONGUEURS EN μ																					
22,5	23	23,5	24	24,5	25	25,5	26	26,5	27	27,5	28	28,5	29	29,5	30	30,5	31	31,5	32	32,5	
4	5	5	4	11	7	7	4	8	6	6	8	2	8	2	4	2	0	0	0	0	100
0	2	5	4	6	10	4	7	10	2	4	0	5	5	2	3	1	1	0	0	0	100
8	5	6	6	3	3	5	0	0	2	2	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	100
3	2	1	1	0	1	2	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
2	2	1	4	3	2	1	3	0	4	0	3	0	2	0	1	0	0	0	0	0	100
2	4	3	10	8	12	10	6	5	3	2	5	3	3	2	0	1	0	1	0	0	100
4	0	4	7	3	5	6	13	6	9	3	5	5	2	2	0	0	0	0	1	0	100
5	6	5	8	5	4	10	4	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
3	3	2	5	5	9	9	3	7	7	1	3	4	2	2	0	0	0	0	0	0	100
5	1	1	8	3	10	5	2	1	3	4	4	0	2	3	2	0	1	0	0	0	100
36	30	33	57	47	63	59	45	42	39	22	28	20	24	14	11	4	2	1	1	1	1.000
3,6	3,0	3,3	5,7	4,7	6,3	5,9	4,5	4,2	3,9	2,2	2,8	2,0	2,4	1,4	1,1	0,4	0,2	0,1	0,1	0,1	

TABLEAU IV. — **Nombres des trypanosomes considérés dans leurs**

JOUR de l'infection.	LONGUEURS EN μ.												
	19	19.5	20	20.5	21	21.5	22	22.5	23	23.5	24	24.5	25
7e	1	0	0	0	1	0	1	2	6	7	4	8	11
8e	1	2	3	3	0	2	4	2	3	2	4	4	11
Au total :	2	2	3	3	1	2	5	4	9	9	8	12	22
P. 100.	1	1	1,5	1,5	0.5	1	2,5	2	4.5	4.5	4	6	11

TABLEAU V. — **Nombre des trypanosomes considérés dans leurs**

JOUR de l'infection.	LONGUEURS EN μ.																	
	13,5	14	14.5	15	15.5	16	16,5	17	17.5	18	18,5	19	12,5	20	20,5	21	21,5	22
6e	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	1	0	5	6	5
7e	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	2	5
8e	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	1	5	0	2	4	3	1	3
9e	0	1	0	2	0	1	5	3	7	12	7	5	0	2	1	5	1	3
10e	2	1	2	7	5	4	6	7	2	1	2	2	0	1	3	3	3	6
11e	0	1	0	0	0	3	5	2	2	2	3	8	2	6	3	2	3	2
12e	0	0	0	0	0	0	1	4	0	3	5	7	3	5	1	3	5	6
13e	0	0	1	0	0	0	1	2	1	2	3	8	1	7	3	2	4	6
14e	0	0	3	0	0	1	2	2	0	1	1	1	3	3	2	5	4	5
15e	0	0	1	0	0	1	0	1	0	2	1	2	4	9	4	8	6	7
Au total :	2	3	7	9	6	10	20	23	14	26	23	38	15	36	21	38	35	48
P. 100.	0,2	0,3	0,7	0,9	0,6	1,0	2,0	2,3	1,4	2,6	2,3	3,8	1,5	3,6	2,1	3,8	3,5	4,8

TABLEAU VI. — **Nombres des trypanosomes considérés dans leurs**

JOUR de l'infection.	LONGUEURS EN μ.													
	18	19	20	20.5	21	21.5	22	22.5	23	23.5	24	24.5	25	25,5
3e	[illegible]	0	1	0	1	3	0	3	1	5	9	5	12	6
4e	1	1	1	1	1	3	0	4	9	4	13	4	7	7
5e	1	1	0	0	5	2	5	7	2	4	11	1	12	10
Au total :	2	2	2	1	7	8	5	14	12	13	33	10	31	23
P. 100.	0,0	0,6	0,6	0.3	2.3	2,6	1,6	4,6	[illegible]	4.3	11	3.3	10.3	7,6

longueurs, chez le cobaye n° 18, du 18 au 19 juillet 1912.

LONGUEURS EN μ.													
25,5	26	26,5	27	27,5	28	28,5	29	29,5	30	30,5	31	31,5	
11	8	7	7	6	6	0	4	3	3	3	1	0	100
11	6	7	6	7	3	8	5	3	1	1	0	1	100
22	14	14	13	13	9	8	9	6	4	4	1	1	200
11	7	7	6,5	6,5	4,5	4	4,5	3	2	2	0,5	0,5	

longueurs, chez la souris n° 8, du 14 au 23 juillet 1912.

LONGUEURS EN μ.																			
22,5	23	23,5	24	24,5	25	25,5	26	26,5	27	27,5	28	28,5	29	29,5	30	30,5	31	31,5	
10	7	2	4	7	10	3	12	8	4	4	5	1	1	1	1	0	0	0	100
3	2	7	10	2	12	8	11	12	7	3	2	4	3	1	1	0	0	0	100
5	8	7	4	5	2	9	10	6	8	1	1	6	3	2	0	0	0	0	100
4	3	1	6	1	6	6	2	5	4	2	1	1	3	0	0	0	0	0	100
4	4	5	5	1	7	4	6	3	2	0	0	1	0	0	0	1	0	0	100
2	8	1	2	2	13	3	9	3	3	5	0	0	3	0	0	1	0	1	100
1	3	7	2	6	0	5	5	6	7	5	3	2	2	0	1	1	1	0	100
3	6	2	3	8	2	7	8	4	3	3	1	0	6	0	1	1	1	0	100
6	6	7	12	6	5	7	2	9	0	5	1	0	0	1	0	0	0	0	100
6	8	10	8	5	7	2	1	2	2	1	0	1	0	0	1	0	0	0	100
44	55	49	56	43	64	54	66	58	40	29	14	16	21	5	5	4	2	1	1.000
4,4	5,5	4,9	5,6	4,3	6,4	5,4	6,6	5,8	4,0	2,9	1,4	1,6	2,1	0,5	0,5	0,4	0,2	0,1	

longueurs, chez la souris n° 9, du 14 au 16 juillet 1912.

LONGUEURS EN μ.														
26	26,5	27	27,5	28	28,5	29	29,5	30	30,5	31	31,5	32	34	
7	0	7	5	8	7	1	3	6	3	1	3	1	1	109
13	8	7	7	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	100
15	5	3	5	3	2	3	1	2	0	0	0	0	0	100
35	13	17	17	14	12	7	4	8	3	1	3	1	1	300
11,6	4,3	5,6	5,6	4,6	4	2,3	1,3	2,6	1	0,3	1	0,3	0,3	

12 août 1912. Les trypanosomes apparaissent dans le sang le 15 août. Le cobaye succombe le 19 août. (Voir courbe 3.)

Souris n° 8, du poids de 25 grammes, est inoculée sous la peau le 9 juillet 1912. Le 13 juillet, les trypanosomes apparaissent dans le sang pris à la queue. Le 24 juillet, la souris meurt. (Voir courbe 4.)

Souris n° 9, du poids de 18 grammes, est inoculée sous la peau le 12 juillet. Elle succombe le 17 juillet. (Voir courbe 5.)

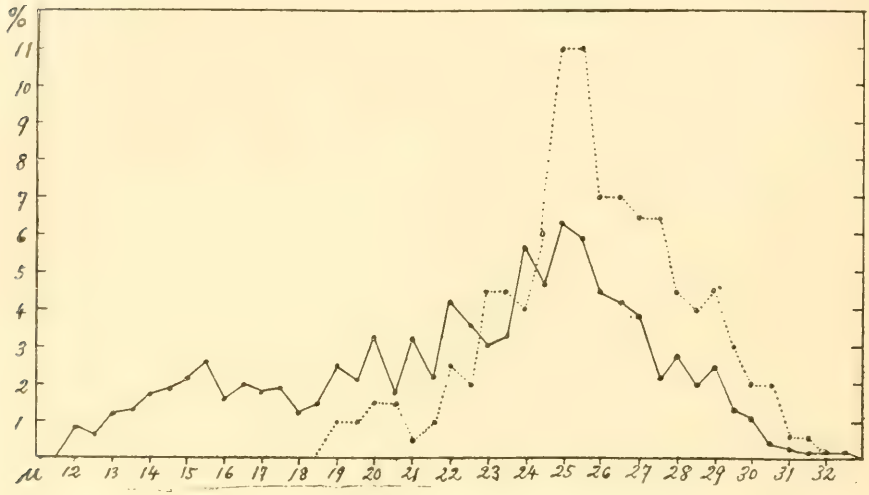


Tableau VII. — La courbe ——— Cobaye n° 76. (Voir tableau III.)
La courbe ..... Cobaye n° 18. (Voir tabteau IV.)

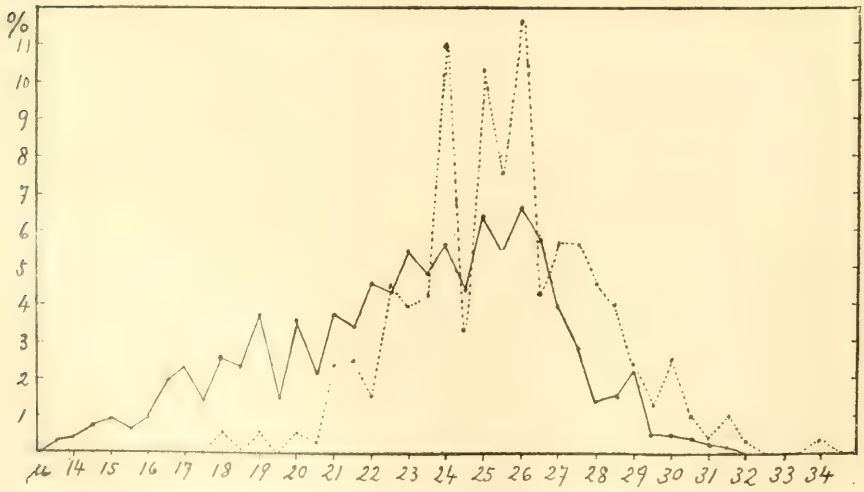


Tableau VIII. — La courbe ——— Souris n° 8. (Voir tableau V.)
La courbe ..... Souris n° 9. (Voir tableau VI.)

Les tableaux ci-dessus donnent la représentation graphique des résultats de nos observations.

Dans les tableaux, la ligne verticale montre le nombre de trypanosomes et la ligne horizontale la longueur en μ.

Ces tracés d'ensemble diffèrent donc d'animal à animal, même à l'intérieur d'une seule espèce (cobaye, souris). On voit ainsi, une fois de plus, avec quelle circonspection il faut se servir des tracés biométriques, même résumant toute une infection, pour caractériser une espèce.

Influence de la température.

Du sang riche en trypanosomes, pris au cœur d'un cobaye infecté, était mélangé à de l'eau physiologique citratée et soumis aux différentes températures pendant des temps différents.

Exp. 1. — A la température du laboratoire, au bout de 30 heures, beaucoup de trypanosomes se sont déformés. Une souris injectée avec du sang ainsi conservé a été infectée avec un retard de 4 jours sur le témoin.

Après 4 jours, on a trouvé très peu de trypanosomes d'aspect normal et mobiles. Le sang injecté à une souris n'a pas produit d'infection.

Au bout de 6 jours, la plupart des parasites étaient détruits et les autres étaient déformés et d'une mobilité très faible.

Exp. 2. — A la glacière, les flagellés se conservent mieux qu'à la température du laboratoire. Après 5 jours, les trypanosomes d'aspect normal et mobiles n'étaient pas rares. Après 8 jours, la majorité étaient altérés ou détruits, et au bout de 14 jours, il n'y avait plus que très peu de trypanosomes encore vivants.

Le sang injecté, au 3e jour, à une souris a produit l'infection avec un retard de 7 jours sur le témoin. 3 souris injectées, aux 8e, 12e et 14e jour, sous la peau (1/10 de cent. cube environ), ont succombé très rapidement : l'une en 4 jours, les autres en 3 jours. Malgré cela, l'examen microscopique du sang et des organes a été toujours négatif. Comme ce fait nous semblait très remarquable, nous avons ensemencé, dans le milieu de gélose ordinaire, de ce sang conservé à la glacière et du sang pris au cœur de l'une des souris ayant succombé, et nous les avons mis à l'étuve à 37 degrés. Mais aucune bactérie ne s'y est développée. Quelle est donc la cause de la mort des animaux? S'il s'agissait d'une toxine due à la destruction du corps des trypanosomes, ce serait une toxine très labile, car l'injection, faite avec le sang conservé jusqu'au 23e jour, à une souris, a donné de nouveau un résultat négatif.

Exp. 3. — A une température variant entre — 5 et — 10 degrés (dans un mélange de glace et de sel), au bout de 1 heure, les trypanosomes étaient encore très vifs et d'aspect normal. Ensuite, à une température entre — 20 et — 15 degrés, au bout de 30 minutes, on a trouvé dans le sang qui s'est décongelé et réchauffé, à la température du laboratoire, un grand nombre de trypa-

nosomes immobiles, déformés, détruits, et très peu d'individus encore mobiles et d'ailleurs altérés. Une souris inoculée avec ces trypanosomes a été infectée avec un retard de 5 jours sur le témoin.

Exp. 4. — A la température de 37 degrés, au bout de 2 heures, le sang contenait beaucoup de trypanosomes immobiles, mais légèrement altérés. Au bout de 4 heures, la plupart étaient immobiles, fortement déformés ou détruits. Le sang injecté à une souris a produit l'infection avec un retard de 6 jours.

Exp. 5. — A la température de 40 degrés, au bout de 2 heures, presque tous les trypanosomes étaient détruits. L'inoculation à une souris a été négative.

En général, les trypanosomes altérés se mettent en têtards ou en boules. A un stade d'altération plus avancé, le protoplasme disparaît d'abord; dans les préparations colorées, on ne voit plus que le noyau plus ou moins pâle et le flagelle avec le blépharoplaste.

Dans toutes ces expériences, aucune des deux formes du trypanosome n'a joui d'une propriété particulière; elles ont été également sensibles aux influences nocives de la température. Nous n'avons pas réussi à séparer l'une de l'autre. Dans tous les cas où l'infection a été positive, on a retrouvé les deux formes du trypanosome dans le sang des souris.

Action des sérums.

Du sérum de cobayes saignés à la période de crise a joui d'un pouvoir protecteur, c'est-à-dire que ce sérum, mélangé aux trypanosomes, allongeait notablement l'incubation chez les souris inoculées.

Pour cette expérience, nous avons employé le sang d'une souris riche en trypanosomes, dilué dans l'eau physiologique citratée. Nous avons préparé cette dilution, en suivant les indications de MM. Mesnil et Brimont, de façon qu'une goutte, examinée entre lame et lamelle à un grossissement de 350 diamètres, montre une dizaine de trypanosomes par champ (Leitz : oculaire compensateur, 12; objectif, 8 millimètres; longueur du tube, 141 millimètres). Nous avons pris 1/10 de cent. cube comme dose étalon.

On ajoute ensuite cette dilution au sérum, en différentes proportions, et après un certain temps de contact, ces mélanges sont injectés sous la peau du dos des souris.

Le tableau ci-contre donne un exemple des résultats de nos expériences.

Comme le montre le tableau, le sérum, aux doses de 1/4 cent. cube et 1/2 cent. cube, a retardé l'incubation de 3 jours, et, à 1 cent. cube, de 4 jours après un contact de 10 minutes.

Au contact du sérum, nous avons pu observer le phénomène d'agglutination des trypanosomes. Par exemple, le sang d'une souris, riche en trypanosomes, dilué dans l'eau physiologique citratée, était mélangé, à parties égales, avec le sérum de la saignée du 14 septembre 1912. Le tube contenant ce mélange a été mis à l'étuve à 37 degrés. Nous en avons pris une goutte et examiné entre lame et lamelle tous les quarts d'heure pendant deux heures et

TABLEAU IX. — **Sérum de la saignée du 14 septembre 1912 (sérum n° 2). Injections après 10 minutes de contact avec les trypanosomes.**

SOURIS n°s.	POIDS (Gr.).	SANG TRYPAN. + SÉRUM	SEPTEMBRE 17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
			Injections.												
31	16	1/10 c.c. + 1/10 c.c	—	—	+	+	+	+ + Mort.	»	»	»	»	»	»	»
32	16	1/10 c.c. + 1/4 c.c.		—	—	—	—	—	+	+	Mort.	»	»	»	»
33	15	1/10 c.c. + 1/2 c.c.		—	—	—	—	—	+	+	+	Mort.	»	»	»
34	14	1/10 c.c. + 1 c.c.		—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	Mort.
Témoin.	17	1/10 c.c.		—	+	+	+	+ + Mort.	»	»	»	»	»	»	»

— Examen microscopique négatif. + Trypanosomes rares. + + Trypanosomes nombreux. + + + Trypanosomes très nombreux.

demie. Dès une demi-heure ou une heure, on a obtenu de belles agglomérations en rosace des éléments flagellés; ils se sont accolés par leur extrémité postérieure.

Au bout de deux heures et demie, il y avait un assez grand nombre d'amas des trypanosomes agglomérés (agglomération secondaire). Tous les trypanosomes avaient encore leurs mouvements propres; il n'y a eu aucune trypanolyse.

Du sérum d'un cobaye neuf n'a donné, dans les mêmes conditions, que de petites agglomérations non persistantes.

Essai de culture.

Nous nous sommes servis du milieu de Novy-Nicolle. Deux essais avec le sang pris au cœur de deux cobayes fortement infectés ont échoué. Dans ce milieu, les trypanosomes n'ont montré aucune multiplication, bien qu'il y eût des individus encore vivants après une vingtaine de jours. Nous avons observé une fois, au 6e jour de l'ensemencement, les trypanosomes en une rosace très nette.

Dans les tubes destinés à la culture, les trypanosomes se déforment en quelques jours. Des granulations très réfringentes apparaissent dans le protoplasme et enfin les trypanosomes succombent.

Les trypanosomes conservés dans le milieu de culture pendant 10 jours et injectés alors sous la peau à un cobaye n'étaient plus virulents. L'examen microscopique du sang jusqu'au 17e jour après l'inoculation restait négatif. Mais l'animal restait sensible à une nouvelle inoculation faite ensuite avec du sang d'un cobaye infecté.

Conclusions.

Nous pouvons résumer ainsi l'ensemble de notre travail :

1° Dans le sang des animaux infectés du *Trypanosoma pecaudi*, nous avons toujours constaté, comme nos devanciers, les deux formes longues-effilées et courtes-trapues. En outre, les formes intermédiaires ne sont pas rares;

2° Chez les formes courtes, nous avons constaté la présence du noyau postérieur. 1 fois sur 823 trypanosomes examinés;

3° Il y a un rapport certain entre l'allure de l'infection et l'apparition des deux formes dans le sang des animaux en expérience. Ce sont les formes longues qui apparaissent d'abord dans le sang. Dès la période moyenne de l'infection, les formes courtes se présentent très nombreuses. Dans la dernière période, les formes longues dominent de nouveau. En cas d'infection d'allure rapide, ce sont les formes longues qui sont les plus nombreuses pendant tout le cours de l'infection. Les tableaux et les tracés publiés donnent une idée précise de la présence et de la variation des diverses formes;

4° Les deux formes sont également sensibles aux influences nocives des différentes températures. Par ce moyen, on ne peut pas séparer l'une de l'autre;

5° Le sérum des cobayes saignés à la période de crise possède un pouvoir protecteur contre l'infection expérimentale;

6° *In vitro*, au contact des éléments flagellés avec le sérum, on constate le phénomène d'agglutination spécifique;

7° Les essais de culture n'ont pas réussi.

BIBLIOGRAPHIE

Brumpt. — *Précis de Parasitologie*, Paris, 1910.

Laveran. — Sur les trypanosomiases du Haut-Niger. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXI, 1907.

Laveran et Mesnil. — *Trypanosomes et trypanosomiases*, Paris, 1912.

Mesnil et Brimont. — Sur les propriétés protectrices du sérum des animaux trypanosomés, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXIII, 1909.

Leger et Ringenbach. — Sur la spécificité de la propriété trypanolytique des sérums des animaux trypanosomés. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXX, p. 343, 1911.

Stephens et Fantham. — On the peculiar morphology of a *Trypanosoma*, etc. *Ann. of trop. Med. and Parasit.*, t. IV, 1911.

Swellengrebel. — Zur Kenntniss des Dimorphismus von *Trypanosoma gambiense* (var. *rhodesiense*). *Centralblatt f. Bakt.* I. Orig., t. LXI, 1911.

Yorke et Blacklock. — A note on the morphology of a Strain of *Trypanosoma equiperdum*. *Brit. med. Journ.*, n° 2696, 1912.

Wenyon. — *Journ. of trop. Med. and Hyg.*, 1er juillet 1912.

SUR QUELQUES PRODUITS DE LA DÉCOMPOSITION DU DEXTROSE EN MILIEU ALCALIN (1)

par A. FERNBACH et M. SCHOEN.

I

L'action des alcalis sur les sucres a donné lieu à un nombre considérable de travaux. Mais la plupart des auteurs, abordant le problème à un point de vue purement chimique, ont étudié l'action brutale des réactifs dans des conditions fort éloignées des influences auxquelles le sucre peut être soumis dans la cellule vivante. Cependant, on a reconnu de bonne heure que les transformations que subissent les sucres sous l'action des alcalis offrent de grandes analogies avec les processus biochimiques de leur dégradation.

L'analogie frappante entre les phénomènes de fermentation et la combustion à la lumière solaire des corps ternaires en solution alcaline a été, pour la première fois à notre connaissance, mise en relief par Duclaux. « Non seulement, dit-il, les produits de la combustion solaire sont tous des produits de fermentation, mais la même substance fermentescible donne volontiers les mêmes produits, qu'on la brûle au soleil ou qu'on la fasse fermenter » [1].

Cette phrase se rapporte principalement à une observation des plus importantes de Duclaux, à savoir que le glucose et le lactose, exposés au soleil en solution alcaline et à l'abri certain de toute ingérence microbienne, donnent naissance à de l'alcool éthylique et à de l'anhydride carbonique.

Cette action de la lumière solaire ne peut pas actuellement être considérée comme spécifique, et la lumière ne doit être envi-

(1) Un résumé de ce travail a été présenté à l'*Académie des Sciences*, séance du 30 mars 1914, t. CLVIII, p. 976.

sagée que comme une forme d'énergie qui intervient dans le phénomène pour amorcer et accélérer la décomposition du sucre. La preuve en est que cette forme d'énergie peut être remplacée par d'autres, notamment par l'énergie calorifique.

C'est ainsi que E. Buchner et J. Meisenheimer [2], en faisant bouillir du sucre interverti avec de la soude concentrée, ont obtenu de l'alcool, caractérisé par sa transformation en éther p-nitrobenzoïque cristallisé, fait qui a été confirmé récemment par des expériences analogues de A. Jolles [3].

Dans ces cas, le rendement en alcool est minime par rapport au sucre mis en œuvre (1). Il est relativement beaucoup plus facile de transformer le glucose en acide lactique sous l'influence des alcalis, réaction dans laquelle les divers auteurs qui se sont occupés de la question ont indiqué des rendements en acide lactique pouvant atteindre et même dépasser 50 p. 100 du poids du sucre décomposé [4].

La dislocation de la molécule de sucre, soit par l'alcali et la lumière solaire, soit par l'alcali et la chaleur, présente quelques caractères tout particuliers, qui impriment au phénomène une allure spéciale. Tout d'abord, pour disloquer cet édifice complexe, il suffit de la présence de traces d'alcali; sans doute l'intensité de la décomposition est fonction de la concentration en alcali; mais il n'y a aucun rapport défini entre les quantités considérables de sucre dont on peut produire la décomposition et les quantités faibles d'alcali qui la provoquent. D'autre part, en dehors de la fixation de l'alcali à l'état de sels par les acides qui prennent naissance, on ne trouve pas de combinaisons définitives entre l'alcali et les produits de la décomposition. Il suit de ce dernier fait, ainsi que de la disproportion entre la quantité de matière décomposée et la quantité du réactif qui en provoque la dislocation, que l'effet des alcalis sur les sucres prend l'allure d'une véritable action catalytique.

C'est là une analogie qui rapproche d'une manière des plus intéressantes, à notre avis, l'action des alcalis sur les sucres des phénomènes de fermentation, que tout le monde actuellement s'accorde pour considérer comme des phénomènes diastasiques,

(1) Buchner et Meisenheimer n'ont obtenu dans leurs expériences que 2 gr. 8 d'alcool en partant de 3 kilogrammes de saccharose.

c'est-à-dire catalytiques. Il y a cependant entre les deux ordres de phénomènes une différence essentielle. Dans les actions catalytiques typiques, telles que l'hydrolyse du saccharose par les acides étendus ou l'oxydation de l'alcool éthylique par le noir de platine, nous avons affaire à une transformation qui reste relativement simple et qui donne naissance à des produits facilement saisissables, de telle sorte qu'on peut suivre la marche de la réaction et en mesurer la vitesse. Les choses se passent tout autrement dans l'action des alcalis sur les sucres : ici, nous avons affaire, pour emprunter à Duclaux une expression imagée, à un écroulement général de la molécule très complexe du sucre, au cours duquel il se forme une foule de corps divers (1). Oxydations et réductions, processus de décomposition et de synthèse se succèdent et se superposent. Les produits intermédiaires de la réaction se mélangent aux produits finaux, et les proportions relatives de tous ces corps dépendent non seulement de la nature et de la concentration de l'alcali, mais encore de la concentration de la solution sucrée et de la température à laquelle la réaction a lieu.

Cette complexité extrême n'exclut pas, néanmoins, l'analogie avec les processus biologiques dont parle Duclaux, surtout si on envisage les phénomènes dans leur ensemble et dans leurs résultats finaux, et si on se borne à comparer le mécanisme de formation des produits qui prennent naissance. Il serait évidemment tout à fait erroné de vouloir chercher autre chose que des analogies et d'étendre systématiquement aux dédoublements biologiques les résultats obtenus dans la décomposition des sucres sous l'influence des alcalis. L'intervention de la cellule vivante donne le plus souvent aux phénomènes une complexité que n'ont pas les processus purement chimiques, et ceux-ci ne peuvent fournir que des indications de travail pour l'étude des processus biologiques. C'est en nous plaçant uniquement à ce point de vue que nous avons été conduits à l'étude des quelques faits exposés dans la présente note.

(1) D'après J. U. Nef [5], chaque hexose en solution alcaline peut donner naissance à 116 corps différents.

II

Les remarquables travaux de C.-A. Lobry de Bruyn et A. v. Ekenstein [6] ont fait voir que, sous l'influence des alcalis, le glucose perd peu à peu son pouvoir rotatoire, et qu'il s'isomérise en même temps, en fournissant du lévulose, du mannose et du glutose. Les autres hexoses, aussi bien cétoses qu'aldoses, subissent des transformations analogues. L'action catalytique des ions oxhydryles n'est pas limitée à ces transpositions intramoléculaires ; elle se poursuit en donnant naissance à toute une série de corps, notamment des acides.

Nous avons répété les expériences des deux savants néerlandais en soumettant du dextrose à l'action ménagée d'alcali dilué, afin de nous rendre compte de la vitesse avec laquelle ce sucre est transformé. A cet effet, des solutions de glucose pur à 5 p. 100 ont été chauffées au bain-marie à 50 degrés en présence de 2 p. 1.000 de carbonate de soude, c'est-à-dire d'une dose d'alcali carbonaté, et non libre, infiniment plus faible que les doses d'alcali caustique employées par Lobry de Bruyn et v. Ekenstein. A divers stades, nous avons déterminé la rotation de la solution sucrée, en même temps que son alcalinité.

Voici, à titre d'exemple, les résultats d'une expérience de ce genre.

SOLUTION DE GLUCOSE A 5 P. 100 ET DE CARBONATE DE SOUDE A 2 P. 1.000 A LA TEMPÉRATURE DE 50 DEGRÉS.

TEMPS en heures.	ROTATION en degrés saccharimétriques.	ALCALINITÉ en c. c. SO^4H^2 N/20. nécessaires pour neutraliser 10 cent. cubes.
0	24,4	7,5
16	4,6	6,5
24	2,7	6,1
40	0	5,6
64	0	5,0
88	0	4,5
Même expérience avec une solution de glucose à 10 p. 100.		
0	48,4	8,1
20	9,4	6,4
44	6,8	5,8
68	5,9	5,2

Ces chiffres font voir tout d'abord que la chute de rotation, très rapide au début, se ralentit peu à peu. La solution de glucose à 10 p. 100, bien que renfermant encore une quantité relativement élevée d'alcali au bout de soixante-huit heures, n'a pas encore atteint au bout de ce temps la neutralité optique, tandis que la solution à 5 p. 100 est déjà optiquement neutre au bout de quarante heures. Il n'y a pas de relation directe entre la diminution de l'alcalinité et la chute de la rotation, car, alors que celle-ci est brusque, la première est progressive; en outre, l'alcalinité continue à diminuer après que la solution sucrée est devenue optiquement inactive. Il apparaît donc que la transformation du dextrose en un mélange inactif et la formation de corps acides sont des processus parallèles, mais indépendants l'un de l'autre.

Nous avons d'ailleurs constaté que les choses se passent de la même manière si l'on chauffe le glucose avec le carbonate de soude, soit dans le vide, soit en présence d'hydrogène, ce qui exclut toute intervention de l'oxygène de l'air dans le phénomène et concorde bien avec les observations faites par Ad. Jolles [3].

Quels sont les acides, et en première ligne les acides volatils, qui se forment lorsqu'on soumet le glucose à un traitement ménagé par le carbonate de soude?

Pour répondre à cette question, nous avons distillé dans le vide la solution sucrée, devenue optiquement neutre à 50 degrés, après l'avoir légèrement acidifiée par l'acide sulfurique. Le distillat acide a été neutralisé par la soude, et évaporé à sec au bain-marie; le résidu repris par l'eau distillée et filtrée a été amené à 150 cent. cubes. Sur 100 cent. cubes, additionnés d'acide sulfurique et amenés à 110 cent. cubes, nous avons dosé les acides volatils par la méthode de Duclaux [7]. Les chiffres de distillation obtenus (1) concordent d'une manière

(1) Voici ces chiffres :

	CHIFFRES trouvés.	CHIFFRES DE DUCLAUX pour l'acide acétique.
	—	—
1.	7,6	7,4
2.	15,4	15,2
3.	23,4	23,4
4.	31,7	32,0
5.	40,8	40,9
6.	49,8	50,5
7.	59,8	60,9
8.	71,0	71,9
9.	84,0	84,4
10.	100,0	100,0

tout à fait satisfaisante avec ceux de l'*acide acétique*. L'action du carbonate de soude sur le glucose à 50 degrés donne donc naissance à de l'acide acétique, dont la production est d'ailleurs confirmée par la formation de cacodyle aux dépens du sel et de l'acide arsénieux et par celle d'acétate d'éthyle lorsqu'on chauffe l'acide avec de l'alcool et de l'acide sulfurique.

Nous avons fait une autre expérience dans laquelle la décomposition du glucose a été plus brutale : nous avons fait tomber le glucose à 5 p. 100 goutte à goutte dans une solution de carbonate de soude à 5 p. 100 maintenue en ébullition par un courant de vapeur d'eau. Dans ce cas également, nous avons constaté que l'acide volatil produit est de l'acide acétique pur (1).

Une partie du distillat obtenu dans cette opération a servi pour préparer un sel de calcium. On a chauffé 100 cent. cubes de liquide, renfermant 0 gr. 504 d'acide volatil exprimé en acide acétique, avec un excès de craie, et, après filtration, on a ramené le volume avec de l'eau distillée à 100 cent. cubes. Dans ce liquide, la chaux a été dosée soit directement, par la calcination du sel organique, soit par précipitation au moyen de l'oxalate d'ammoniaque. La moyenne de trois déterminations concordantes conduit par le calcul à une quantité totale de 0 gr. 233 CaO dans les 100 cent. cubes, soit 0 gr. 6.574 d'acétate de chaux, au lieu de 0 gr. 6.636 qu'on obtient en supposant que la totalité de l'acide volatil était de l'acide acétique.

Calculé pour $C^2H^3O^2\,^2Ca$.	35,44	p. 100 CaO.
Trouvé	35,11	— —

La formation de l'acide acétique est donc indiscutable. Cet acide se forme d'ailleurs en quantité très notable, car, sans tenir compte des pertes inévitables, nous en avons obtenu 0 gr. 756 en partant de 12 gr. 5 de glucose, ce qui correspond à un rendement de 6 p. 100.

Il n'y a pas lieu d'être surpris de trouver ainsi l'acide acétique

(1) Chiffres trouvés dans le dosage par la méthode de Duclaux :

1	7,6	6	49,7
2	15,3	7	59,7
3	23,1	8	70,9
4	31,7	9	83,7
5	40,6	10	100,0

parmi les produits de la décomposition du glucose par le carbonate de soude. Le fait concorde tout à fait avec les vues de Duclaux, qui attribue avec raison sa présence constante comme produit final des réactions chimiques ou biochimiques à ce qu'il est relativement stable dans les conditions et dans le milieu où il est formé. L'acide acétique a d'ailleurs été rencontré récemment par Jolles [3], à côté de l'alcool, dans la décomposition de certains sucres par la soude caustique, et Duclaux lui-même avait observé sa formation en exposant à l'action de la lumière solaire, non pas, il est vrai, le glucose, mais les lactates alcalins.

Ce qui est difficile à admettre, c'est la formation directe de l'acide acétique aux dépens du glucose, et il semble bien plus logique de penser qu'on n'arrive à ce terme final qu'en passant par des corps intermédiaires dérivant plus ou moins directement de la molécule de sucre. On comprend ainsi que ces substances, moins stables que l'acide acétique lui-même, puissent subir des transformations ultérieures qui ne conduisent pas nécessairement à l'acide acétique, et que ce dernier acide puisse, dans certains cas, faire défaut.

Nous sommes mis en présence d'un cas semblable par un travail de Ed. Buchner, J. Meisenheimer et H. Schade [8], dont les résultats sont particulièrement intéressants pour la question qui nous occupe. L'un de ces auteurs, H. Schade, avait antérieurement [9] cru observer que l'oxydation du glucose par l'eau oxygénée en milieu alcalin fournit à la fois de l'acide formique et de l'aldéhyde acétique, ou le produit d'oxydation de ce dernier corps, l'acide acétique. Dans cette transformation, chaque molécule de sucre fournirait 2 molécules d'aldéhyde acétique et 2 molécules d'acide formique, d'après l'équation :

$$C^6H^{12}O^6 = 2\ C^2H^4O + 2\ CH^2O^2.$$

Dans un travail qui semble trop peu connu, H. Sainte-Claire Deville et H. Debray [10] ont indiqué que, soumis à l'action catalytique du rhodium pulvérulent, l'acide formique se décompose en hydrogène et en anhydride carbonique. Schade a mis à profit cette observation, en montrant que le même catalyseur transforme le mélange en question, aldéhyde acétique et acide formique, en alcool éthylique et acide carbonique; et, en se

basant sur ces faits, il a imaginé un schéma de la fermentation alcoolique d'après lequel la molécule de sucre se décomposerait d'abord en aldéhyde acétique et acide formique, ces deux corps réagissant ensuite l'un sur l'autre pour fournir de l'alcool et de l'acide carbonique. C'est ce qu'il désigne, dans le titre même de son mémoire, sous la dénomination : « Fermentation alcoolique des sucres sans enzymes ».

Buchner et Meisenheimer ont pensé avec raison que ce travail méritait d'être soumis à un examen critique, et c'est cette revision qu'ils ont entreprise en collaboration avec Schade lui-même. Ils ont d'abord constaté que la soi-disant transformation intégrale du sucre en aldéhyde acétique et acide formique exigeait une sérieuse rectification. En effet, l'acide formique ne représente qu'une fraction des acides résultant de la décomposition du glucose en milieu alcalin, en présence d'eau oxygénée, et non la totalité, comme Schade l'avait admis à la suite d'une simple titration. Ensuite, la recherche de l'aldéhyde et de l'acide acétique n'a donné que des résultats négatifs. Par contre, ces auteurs ont trouvé de l'*acide glycolique* et de l'*acide trioxybutyrique*, mélangés très probablement avec d'autres corps acides. Ils ont été ainsi conduits à la conclusion que « ces décompositions des sucres ne représentent que des phénomènes d'oxydation, et ne peuvent pas être rapprochés de ceux de la fermentation alcoolique ».

Ces résultats justifient-ils l'abandon pur et simple du schéma de Schade, et sont-ils incompatibles avec ce schéma, notamment en ce qui concerne la formation de l'acide glycolique? Évidemment non. En effet, l'acide glycolique, $CH^2OH.COOH$, peut être envisagé comme l'oxyacide correspondant à l'acide acétique, $CH^3.COOH$, ce qui conduirait à penser que, dans les conditions des expériences de Buchner, Meisenheimer et Schade, c'est-à-dire sous l'influence de l'eau oxygénée, ou d'un fort courant d'air en milieu alcalin, il y a eu oxydation du groupe méthyle, sinon dans l'acide acétique, ce qu'on aurait peut-être quelque difficulté à admettre, tout au moins dans le composé qui le précède. Chimiquement, une oxydation de ce genre n'est nullement impossible ; elle a même été réalisée pour l'aldéhyde acétique, ainsi qu'il résulte des observations de G. W. Heimrod et P. A. Levene [11], qui ont obtenu de l'aldéhyde

glycolique parmi les produits d'oxydation de l'aldéhyde acétique en milieu alcalin.

On serait ainsi conduit à la conclusion que le fait d'avoir trouvé de l'acide glycolique comme produit de la réaction n'exclut nullement la production préalable de l'acide acétique, ou au moins d'aldéhyde acétique, c'est-à-dire un mécanisme analogue à celui que nous avons constaté plus haut dans la décomposition du glucose par les alcalis.

III

Quelle est l'origine de l'acide acétique dont nous venons de constater la formation dans l'action de l'alcali sur le glucose? Ne pourrait-on trouver à cet égard des indications utiles en étudiant les produits volatils non acides qui se forment en même temps que l'acide acétique?

Pour pouvoir répondre à cette question, nous avons fait un certain nombre d'essais en employant le dispositif suivant, destiné à permettre de recueillir les corps volatils non acides au fur et à mesure de leur formation. Dans un ballon à distillation, renfermant une solution de carbonate de soude à 5 p. 100, on introduit goutte à goutte, à l'aide d'un entonnoir à robinet, une solution de glucose à 5 p. 100. On maintient l'ébullition à l'aide d'un courant de vapeur d'eau, qu'on règle de telle sorte que le niveau reste à peu près constant dans le ballon de manière à éviter la concentration du carbonate de soude. On recueille le liquide qui distille dans un récipient fortement refroidi.

Ce distillat donne avec la soude et l'iode, dissous dans l'iodure de potassium, un abondant précipité d'iodoforme *à froid*. Il réduit le réactif de Nessler à l'état métallique et fournit avec le nitrate d'argent ammoniacal un miroir d'argent. Il décolore instantanément une solution alcaline de bleu de méthylène, et réduit fortement *à froid* la liqueur de Fehling. Nous nous trouvons donc en présence de corps aldéhydiques ou cétoniques.

Parmi ces corps, il faut exclure la présence de l'aldéhyde acétique, car nous n'avons obtenu ni la recoloration de la fuchsine, décolorée par l'acide sulfureux, ni la coloration bleue caractéristique que fournit cette aldéhyde avec le nitroprussiate

de soude et la triméthylamine (réaction de Simon) (1). D'autre part, comme nous avons constaté que les produits volatils qui donnent la réaction de l'iodoforme peuvent être retenus par le bisulfite de soude, nous pouvons également affirmer l'absence de l'alcool éthylique.

Chauffé avec la phénylhydrazine en solution acétique, le distillat a fourni un produit cristallin, soluble dans l'alcool. Par recristallisation dans ce dissolvant, on a obtenu finalement une osazone fondant à 146-147 degrés, que l'oxydation par le bichromate de potasse, en présence d'acide acétique, selon les indications de H. von Pechmann [15], transforme en une tétrazone fusible à 101-102 degrés. Ce produit, plus stable que l'osazone dont il dérive, a été soumis à l'analyse après plusieurs recristallisations dans l'éther et l'acétone.

0 gr. 0534 de substance ont donné à 19 degrés et 756 millimètres de pression	10 c.c. 4 d'azote.
Calculé pour $C^{15}H^{14}N^4$	22,4 p. 100 d'azote.
Trouvé.	22,6 p. 100 d'azote.

Il s'agit donc bien ici de la *méthylglyoxaltétrazone*, formée aux dépens de la *méthyglyoxalosazone*. Ce dernier corps peut provenir lui-même soit de l'alcool pyruvique, soit de l'aldéhyde pyruvique, ces deux composés fournissant la même osazone, et c'est là un point qui mérite d'être examiné, bien qu'il soit actuellement difficile de le trancher d'une manière définitive.

Divers auteurs ont déjà entrevu la possibilité de la formation de méthylglyoxal (aldéhyde pyruvique) au dépens des sucres par voie purement chimique. C'est ainsi que G. Pinkus [16] a constaté que lorsqu'on chauffe du glucose en milieu alcalin avec de la phénylhydrazine, il y a production de méthylglyoxalosazone, fait confirmé par les expériences de J.-U. Nef [17]. Mais, tandis que Pinkus semble porté à admettre que cette osazone dérive de l'alcool pyruvique (acétol), Nef est d'avis que c'est l'aldéhyde pyruvique (méthylglyoxal) qui résulte de la

(1) Cette réaction est désignée dans la littérature allemande sous le nom de Rimini, alors qu'en réalité elle a été indiquée pour la première fois par L. Simon [13], et que Rimini [12] n'a fait que l'étudier de plus près. Tout récemment, A. v. Lebedew [14] indique comme nouveau le fait que la présence d'ammoniaque gêne la réaction (qu'il appelle, lui aussi, réaction de Rimini); ce fait avait déjà été signalé par Simon.

décomposition des sucres par les alcalis, car en milieu alcalin l'acétol se polymérise avec une facilité extrême, en donnant naissance à des résines très compliquées. Ce sont d'ailleurs ces composés résineux mal définis qui, d'après Nef, communiquent leur couleur brune intense aux solutions alcalines des sucres.

Quelle que soit la nature du composé fournissant la méthylglyoxalosazone, les expériences que nous avons résumées plus haut apportent la preuve directe que l'action de l'alcali sur le glucose donne naissance à un corps au moins appartenant au groupe pyruvique (1). Les conditions que nous avons réalisées dans ces expériences, dans lesquelles les produits volatils échappent plus ou moins à une transformation ultérieure, permettent de retrouver ces produits en quantité très notable. Ainsi, 500 cent. cubes du distillat provenant de 12 gr. 5 de glucose ont fourni 1 gr. 48 de méthylglyoxalosazone ; et 10 cent. cubes de ce liquide absorbaient 62 c. c. 8 d'iode N/20. Par contre, dans les expériences du chapitre précédent, dans lesquelles le carbonate de soude a agi sur le glucose à l'ébullition, la production des corps cétoniques a été minime, et il se peut que ce soit là la raison pour laquelle leur formation a échappé à divers auteurs.

Quel est le rôle des corps du groupe pyruvique dans la production de l'acide acétique aux dépens du glucose (2) ? Prenant pour point de départ le fait, démontré plus haut, de la présence de corps de ce groupe dans les produits de décomposition du glucose par les alcalis, et admettant avec Nef que c'est l'aldéhyde pyruvique qui se forme tout d'abord, nous pouvons imaginer que cette aldéhyde donne naissance, en vertu des propriétés caractéristiques des aldéhydes (réaction de Cannizzaro), d'une part à l'alcool correspondant, l'acétol, et d'autre part à l'acide correspondant, l'acide pyruvique.

$$\left.\begin{matrix} CH^3 - CO - CHO \\ CH^3 - CO - CHO \end{matrix}\right\} + \left\{\begin{matrix} H^2 \\ O \end{matrix}\right\} = \begin{matrix} CH^3 - CO - CH^2OH \\ CH^3 - CO - COOH \end{matrix}$$

(1) Tout dernièrement, H. D. Dakin et H. W. Dudley [18] ont montré que le glucose, distillé avec du phosphate de sodium, fournit un corps du groupe pyruvique, qu'ils ont isolé à l'état de méthylglyoxal-p. nitrophénylosazone.

(2) La possibilité de divers mécanismes de formation de ces corps aux dépens des sucres a été développée avec une remarquable netteté par A. Wohl [19], dans une conférence faite en 1907, à l'Assemblée générale des chimistes allemands, à Dantzig.

On sait que l'acide pyruvique peut facilement perdre de l'anhydride carbonique pour donner naissance à l'aldéhyde acétique, ou, lorsqu'il est soumis à l'action d'un agent oxydant, à de l'acide acétique.

Nous trouvons ainsi une explication logique pour les faits expérimentaux que nous avons observés. Une partie de l'aldéhyde pyruvique formée est entraînée par la vapeur d'eau; une autre se transforme en acétol et en acide pyruvique. L'acétol, à son tour, peut être en partie entraîné par la vapeur d'eau, et fournir, en même temps que l'aldéhyde pyruvique, à laquelle il se trouve mélangé dans le distillat, la méthyglyoxalosazone; tandis que le reste de l'acétol se transforme en résines qui colorent fortement la solution sucrée. Quant à l'acide pyruvique, il est transformé en anhydride carbonique et acide acétique, dont la présence est facile à mettre en évidence.

Cette manière de concevoir la formation de l'acide acétique aux dépens du glucose, n'implique pas la production d'acide formique. De fait, nous n'avons pas pu le retrouver dans nos expériences, la totalité des acides volatils étant constituée par de l'acide acétique seul. L'absence d'acide formique peut d'ailleurs expliquer pourquoi nous n'avons pas trouvé d'alcool éthylique; et nous aurons plus loin l'occasion d'insister sur cette explication.

IV

Nous venons d'indiquer un mécanisme de la formation de l'acide acétique aux dépens du glucose sous l'influence des alcalis. Ce n'est assurément pas le seul qui se présente à l'esprit. Parmi les nombreuses hypothèses imaginées par divers auteurs, l'une des plus intéressantes, celle qui mérite de fixer notre attention, c'est l'hypothèse de l'intervention de l'*acide lactique* comme produit intermédiaire.

Nous avons déjà indiqué plus haut que l'acide lactique a été obtenu par divers savants en faisant agir les alcalis sur les sucres. D'autre part, en exposant l'acide lactique ou des lactates à l'action de la lumière solaire, Duclaux [1] a observé la formation d'acide acétique et d'alcool éthylique; mais, chose curieuse, il se produit de l'alcool en présence de potasse et non en pré-

sence de baryte [20]. « Le sucre, dit Duclaux, donne toujours de l'acide lactique en présence de tous les alcalis; mais, en présence de la baryte, le lactate formé ne donne pas d'alcool, tandis qu'il en donne en présence de la potasse ».

Voilà, nettement exprimée, l'idée que l'acide lactique doit jouer le rôle de corps intermédiaire dans la formation de l'alcool aux dépens des sucres, hypothèse qui est encore actuellement très controversée, surtout lorsqu'elle s'applique à la production biochimique de l'alcool.

Rien de plus simple en apparence que d'expliquer de cette manière la formation d'acide acétique aux dépens du glucose : la molécule de sucre se dédoublerait en deux molécules d'acide lactique, dont chacune se décomposerait en anhydride carbonique et alcool éthylique,

$$C^6H^{12}O^6 = 2C^3H^6O^3$$
$$C^3H^6O^3 = CO^2 + C^2H^5OH,$$

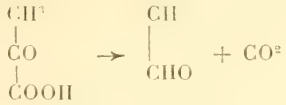
ce dernier corps fournissant finalement de l'acide acétique par oxydation.

Mais cette simplicité n'est qu'apparente, car, si on examine la structure moléculaire des corps qui interviennent dans ces équations, et non leur formule brute, on reste convaincu que les phénomènes sont beaucoup plus complexes. En effet, considérons d'abord la formation de l'alcool éthylique ou de l'acide acétique aux dépens de l'acide lactique, réalisée dans les expériences de Duclaux. Il y a évidemment là un processus d'oxydation, qui comporte la formation d'acide carbonique, comme l'a déjà fait voir Duclaux [1] (*loc. cit.*, p. 28), c'est-à-dire d'un corps plus oxydé que l'acide lactique. Sur quel point de la molécule de l'acide lactique va tout d'abord porter cette oxydation? Évidemment sur la fonction alcool secondaire, qui est la plus facilement oxydable, et qui sera transformée en fonction cétonique :

$$\begin{array}{ccccc} CH^3 & & & & CH^3 \\ | & & & & | \\ CHOH & + & O & = & CO + H^2O \\ | & & & & | \\ COOH & & & & COOH \end{array}$$

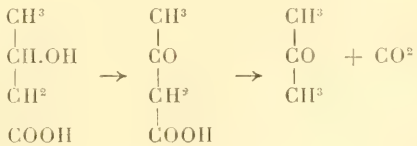
En d'autres termes, comme l'indique l'équation ci-dessus, l'acide lactique est transformé tout d'abord en *acide pyruvique*.

Ensuite, ce dernier corps, qui partage avec tous les acides cétoniques qui renferment un CO dans la position 2 ou 3 la propriété de céder facilement de l'anhydride carbonique, donne naissance à de l'aldéhyde acétique,



aldéhyde qui, oxydée à son tour, fournit de l'acide acétique.

Ce n'est pas là un processus isolé, exceptionnel, car on le retrouve dans la transformation de l'acide β-oxybutyrique en acétone. L'oxydation de la fonction alcool secondaire de cet acide fournit, comme on le sait, de l'acide acéto-acétique, dans lequel le groupement cétonique se trouve dans la position 3, et dont la décomposition *spontanée* en acétone et anhydride carbonique est bien connue :



On voit donc que l'acide acétique (comme d'ailleurs l'alcool) ne saurait dériver directement de l'acide lactique, et qu'il ne peut en provenir que par une voie détournée, en passant par l'acide pyruvique.

La formation de l'acide lactique aux dépens du glucose n'est pas moins compliquée, car il est véritablement difficile de concevoir le passage *direct* du second de ces corps au premier, lorsqu'on considère la structure de leurs molécules. Par contre, la formation facile de l'aldéhyde pyruvique aux dépens du glucose, que nous avons montrée dans le chapitre précédent, ainsi que les expériences de Nef [17] (*loc. cit.*, p. 255), permettent de considérer comme vraisemblable que lorsque le glucose donne naissance à de l'acide lactique, c'est en passant par l'aldéhyde pyruvique. Il est, en effet, très facile de passer de ce dernier corps à l'acide lactique; il suffit de chauffer sa

solution aqueuse à 100 degrés pour provoquer une fixation d'eau et une transposition moléculaire,

$$\begin{array}{ccc} CH^3 & & CH^3 \\ | & & | \\ CO & + H^2O = & CHOH \\ | & & | \\ CHO & & COOH \end{array}$$

réaction qui peut même se faire à froid, en présence de la potasse, comme le font voir les belles expériences de Mlle W. Denis [21].

Tout porte donc à croire que, quand il se forme de l'acide lactique aux dépens du glucose, cet acide est précédé par un composé du groupe pyruvique. Mais cette production d'acide lactique dans l'action des alcalis sur le glucose n'est pas un fait constant, car nous n'avons pas pu mettre cet acide en évidence dans nos expériences, ni avec le carbonate de soude très dilué à 50 degrés, ni avec du carbonate à 5 p. 100 à 100 degrés. D'ailleurs, Buchner, Meisenheimer et Schade [8] n'ont pas non plus trouvé d'acide lactique parmi les produits d'oxydation du sucre par l'eau oxygénée.

Nous ne voulons pas dire par là que ces résultats négatifs excluent la formation de l'acide lactique, car on pourrait supposer que, dans le passage du glucose à l'acide acétique, l'acide lactique se forme d'une manière transitoire, pour être détruit au fur et à mesure de sa production. Mais cette supposition ne serait justifiée qu'autant qu'on aurait constaté que l'acide lactique, traité par les alcalis dans les mêmes conditions que le glucose, est capable de fournir de l'acide acétique. Que nous répond l'expérience sur ce point? Sa réponse est négative. En traitant soit de l'acide lactique, soit des lactates, par le carbonate de soude, dans les conditions dans lesquelles nous avons traité le glucose, nous n'avons pas pu arriver à obtenir de l'acide acétique. Ce résultat est en désaccord avec ceux de Duclaux, qui a obtenu de l'acide acétique, à côté d'alcool éthylique, en soumettant des lactates à l'action de la lumière solaire, conditions qui sont, sans doute, plus favorables à l'oxydation.

Si, dans les conditions de nos expériences, l'acide lactique ne satisfait pas aux caractères qu'on est en droit d'en exiger

pour pouvoir lui attribuer le rôle de corps intermédiaire entre le glucose et l'acide acétique, il n'en est pas de même de l'acide pyruvique. Bien que nous ne soyons pas arrivés à mettre cet acide en évidence parmi les produits de décomposition du glucose, mais seulement l'aldéhyde qui lui correspond, il n'en est pas moins du plus haut intérêt de constater que, traité par les alcalis dans les mêmes conditions que le sucre, l'acide pyruvique fournit de l'acide acétique. En voici la preuve expérimentale :

5 cent. cubes d'acide pyruvique pur, préparé au laboratoire par la méthode de E. Erlenmeyer [22], modifiée par L. Simon [23], ont été dissous dans 50 cent. cubes d'eau, et la solution a été introduite goutte à goutte dans une solution de potasse à 10 p. 100, maintenue en ébullition par un courant de vapeur d'eau. Le distillat qui passe d'abord est neutre, et ne renferme pas de produits cétoniques. On acidifie alors le liquide avec de l'acide sulfurique et on recommence à distiller. On recueille un distillat acide, qui est neutralisé par la soude et évaporé à sec. On reprend le résidu par l'eau et, sur une partie de la solution, on dose les acides volatils par la méthode de Duclaux. Voici les chiffres obtenus :

1.	7,8	6.	50,9
2.	15,9	7.	60,9
3.	23,4	8.	71,8
4.	32,8	9.	84,2
5.	41,7	10.	100,0

La quantité totale d'acide passé à la distillation correspond à 64 cent. cubes de soude décime.

Les chiffres correspondent bien à ceux de l'acide acétique. La décomposition de l'acide pyruvique par la potasse fournit donc de l'acide acétique.

Les faits que nous venons d'exposer conduisent tout naturellement à se demander si véritablement, parmi les produits intermédiaires par lesquels passe le sucre avant de prendre la forme d'acide acétique et d'alcool, l'acide lactique joue le rôle qu'on lui a si souvent attribué. N'est-il pas plus logique et plus conforme aux faits expérimentaux d'admettre que l'acide acétique dérive directement des corps du groupe pyruvique, notamment de l'aldéhyde et de l'acide pyruvique?

V

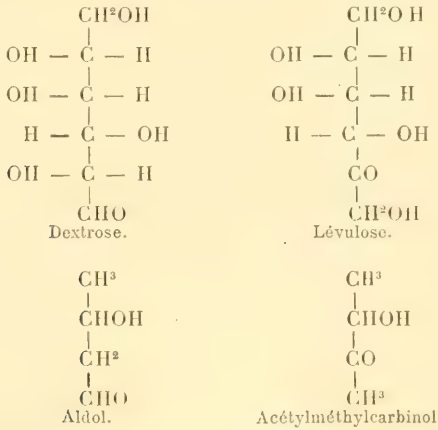
Si l'on se range à cette manière de voir, on est conduit à admettre, comme conséquence logique et nécessaire, que l'acide acétique est précédé transitoirement par l'aldéhyde acétique. Au sujet de la formation de cette aldéhyde, nous possédons bien quelques indications, mais aucune donnée suffisamment nette pour entraîner la conviction. Cette critique s'applique aussi bien aux expériences de Framm [24] sur l'oxydation des sucres en milieu alcalin qu'à celles de Schade [9], qui a repris le travail de Framm; et, comme l'on fait remarquer avec raison Buchner, Meisenheimer et Schade [8], les réactions sur lesquelles ces auteurs basent leurs affirmations ne suffisent aucunement pour caractériser l'aldéhyde acétique. Nous avons déjà indiqué nous-mêmes plus haut que, dans nos expériences, nous ne sommes pas arrivés à mettre cette aldéhyde en évidence.

Y a-t-il lieu de s'étonner de ce résultat négatif? N'oublions pas qu'il s'agit ici d'un corps formé transitoirement, c'est-à-dire qui ne pourrait être présent qu'à l'état de traces, et que de plus son instabilité même vis-à-vis des agents chimiques, la facilité avec laquelle il se polymérise, surtout en présence d'alcali, pour fournir des corps à molécule plus complexe, expliquent aisément pourquoi on ne le retrouve pas.

Quelles sont donc les transformations que peut subir facilement l'aldéhyde acétique? Les intéressantes observations de G. W. Heimrod et P. A. Levene, publiées dans le supplément du travail que nous avons déjà mentionné [11], font voir que déjà, à l'air, l'aldéhyde absorbe de l'oxygène pour donner de l'acide acétique. L'aldéhyde acétique peut également fournir de l'acide formique, soit par oxydation électrolytique [25], soit sous l'influence de l'eau oxygénée en milieu alcalin, et c'est probablement là l'origine de l'acide formique trouvé par Buchner, Meisenheimer et Schade, parmi les produits de la décomposition alcaline des sucres.

En dehors de ces produits de dégradation de sa molécule, l'aldéhyde acétique peut s'aldoliser en milieu alcalin, en donnant lieu à de véritables synthèses, c'est-à-dire à des molécules plus complexes que celle du corps primitif. C'est ainsi qu'il

peut se former de l'aldol ou aldéhyde β-oxybutyrique, si l'on en juge d'après les résultats auxquels sont arrivés W. Loeb et G. Pulvermacher [26], qui, en traitant par la phénylhydrazine les produits volatils de l'action de l'hydroxyde de plomb sur le glucose, ont isolé, à côté de la méthylglyoxalosazone, l'osazone du biacétyle ou de l'acétylméthylcarbinol. Cette osazone peut dériver soit de l'acétylméthylcarbinol, formé aux dépens de l'aldol, soit de l'aldol lui-même. En effet, l'acétylméthylcarbinol, isomère cétonique de l'aldol, peut prendre naissance aux dépens de l'aldol en milieu alcalin, en vertu d'un processus de transposition moléculaire analogue à celui qui a permis à Lobry de Bruyn et v. Ekenstein de passer du glucose, qui est un aldose, au lévulose qui en est l'isomère cétonique.

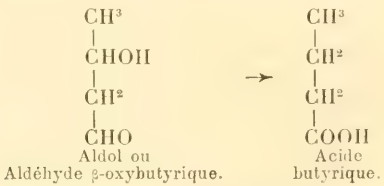


On peut citer encore, comme exemple d'une transposition moléculaire de ce genre, la transformation de l'aldéhyde glycérique en dioxyacétone, signalée par A. Wohl et C. Neuberg [27].

Nous avons, dans les conditions de nos expériences, fait quelques observations qui confirment les résultats auxquels sont arrivés Loeb et Pulvermacher par une méthode différente. Si, en effet, nous ne sommes pas arrivés, comme nous l'avons déjà dit, à déceler la présence d'aldéhyde acétique, nous avons, par contre, recueilli des indications qui rendent la production d'aldol infiniment probable. Le liquide distillé, de la page 700, qui a fourni de la méthylglyoxalosazone, fournit de l'aldé-

hyde acétique lorsqu'on le distille avec de l'acide sulfurique; cette aldéhyde a été caractérisée par la réaction de Simon et par la formation de sa p-nitrophénylhydrazone. En outre, à côté de la méthylglyoxalosazone, nous avons obtenu à l'état de traces, avec le liquide primitif, une autre combinaison de la phénylhydrazine, insoluble dans l'alcool et fondant au-dessus de 200 degrés. Malheureusement, la petite quantité de ce corps ne nous a pas permis de le purifier suffisamment et de pouvoir l'identifier d'une façon plus certaine.

L'aldolisation de l'aldéhyde acétique présente encore l'intérêt de fournir une explication relativement simple d'un fait très curieux observé par Duclaux [1 et 28]. En oxydant au soleil l'acide lactique ou les lactates en présence de sels de mercure, Duclaux a constaté la formation d'*acide butyrique*. Là encore, on est conduit à invoquer un mécanisme analogue à celui que nous avons esquissé plus haut : l'acide lactique, passant sous la forme d'acide pyruvique, fournit de l'aldéhyde acétique, qui, en s'aldolisant, donne l'aldéhyde β-oxybutyrique; il suffit de la réduction de la fonction alcool secondaire de ce corps et de l'oxydation de son groupement aldéhydique, ou, si l'on veut, du transport de l'oxygène de la première de ces fonctions sur la deuxième, pour donner naissance à l'acide butyrique (1).



Peut-être y a-t-il lieu d'expliquer par un mécanisme analogue la formation de l'acide trioxybutyrique dans l'oxydation des sucres, observée tout d'abord par Börnstein et Herzfeld [31], et confirmée par divers auteurs, entre autres par Buchner, Meisenheimer et Schade [8].

(1) Cette conception est tout à fait d'accord avec les considérations sur la fermentation butyrique exposées en 1908 par Ed. Buchner et J. Meisenheimer [29]. C'est ainsi d'ailleurs qu'a été expliquée antérieurement la production de l'acide β-oxybutyrique aux dépens des sucres par Spiro, ainsi que par Hugounenq (*Revue de Médecine*, t. VIII, 301; 1887), dont les conceptions sont discutées par Ad. Magnus-Lévy, dans son travail bien connu sur le diabète [30].

Ainsi la production transitoire d'aldéhyde acétique dans la décomposition des sucres, sous l'influence des alcalis, permet d'expliquer nombre de réactions synthétiques qui accompagnent cette dégradation. Peut-être aussi faut-il attribuer à cette aldéhyde un rôle non moins important dans la production de l'alcool éthylique, obtenu par Duclaux en soumettant le sucre en solution alcaline à l'action de la lumière solaire. Le passage de l'aldéhyde à l'alcool par réduction semble tout naturel. Mais quel est l'agent de réduction qu'il faut faire intervenir? C'est très vraisemblablement l'acide formique, qu'on retrouve parmi les produits de décomposition du sucre par les alcalis chaque fois qu'il y a formation d'alcool. Cet acide est décomposé en anhydride carbonique et hydrogène, soit qu'on l'expose à la lumière solaire, comme l'a fait voir Duclaux dans le travail que nous avons si fréquemment cité, soit qu'on le soumette à l'action du rhodium pulvérulent, comme l'ont vu Sainte-Claire-Deville et Debray [10]. Il serait dès lors tout à fait logique d'admettre que, dans l'expérience de Duclaux, la lumière solaire et l'alcali ont la même action catalytique que le rhodium dans l'expérience de Schade, et que, dans les deux cas, l'acide formique réagit de la même manière sur l'aldéhyde acétique pour donner naissance à de l'alcool éthylique et de l'anhydride carbonique.

L'alcool éthylique serait ainsi le produit de réduction de l'aldéhyde, comme l'acide acétique en est le produit d'oxydation.

*
* *

En exposant les considérations qui précèdent, nous n'avons pas eu la prétention d'étudier dans son ensemble la décomposition du glucose sous l'influence des alcalis; car il est évident qu'entre le sucre et les corps saisissables dont nous avons reconnu la présence, il y a place pour nombre de produits intermédiaires. Nous avons voulu simplement rechercher si l'analogie signalée par Duclaux entre les termes ultimes de cette dégradation et ceux que fournissent les processus de fermentation ne pourrait pas s'appliquer aussi aux termes intermédiaires de la réaction que nous avons pu mettre en évidence. A ce point de vue, les corps du groupe pyruvique, dont nous avons constaté la formation, offrent une indication très pré-

cieuse pour les recherches ultérieures dans le domaine biochimique. Cette manière de voir est d'autant plus justifiée que l'attention a été récemment attirée par Neuberg et ses collaborateurs sur l'importance du rôle de l'acide pyruvique comme produit intermédiaire possible dans la décomposition biochimique du sucre, et que nous avons nous-mêmes démontré dernièrement la présence de cet acide parmi les produits de la vie de la levure [32].

Ces corps du groupe pyruvique sont-ils véritablement la forme qui précède nécessairement et constamment l'alcool dans la fermentation ? Pour pouvoir répondre à cette question, il est évident qu'il faut réaliser des conditions qui permettent à ces corps de s'accumuler dans le liquide qui fermente, et c'est là le but vers lequel tendent nos expériences en cours.

Mars 1914.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

[1] E. Duclaux. — Action de la lumière solaire sur les substances hydrocarbonées. Extrait des *Annales de l'Institut Nat. Agr.*, t. X, p. 39 ; 1887.

[2] Ed. Buchner et J. Meisenheimer. — Die chemischen Vorgänge bei der alkoholischen Gärung. *Ber. d. deutsch. chem. Ges.*, t. XXXVIII, p. 624 ; 1905.

[3] Ad. Jolles. — Zur Kenntnis des Zerfalls der Zuckerarten. *Bioch. Zeitschr.*, t. XXIX, p. 152 ; 1910.

[4] Nencki et Sieber. — *Journ. f. pr. Chem.* [2], t. XXIV, p. 498 ; 1881. — Schutzenberger. *Bull. Soc. Chim.* [2], t. XXV, p. 289.

[5] J. U. Nef. — Dissoziationsvorgänge in der Zuckergruppe. *Liebig's Annalen*, t. CCCLXXVI, p. 109 ; 1910.

[6] C. A. Lobry de Bruyn et A. v. Ekenstein. — Einwirkung von Alkalien auf Kohlenhydrate. *Ber. d. deutsch. chem. Ges.*, t. XXVIII, p. 3078 ; 1895 et *Rec. d. Tr. chim. des Pays-Bas*, t. XIV, p. 78, 156, 203 et t. XVI, p. 257, 262, 274.

[7] E. Duclaux. — Sur le dosage des alcools et des acides volatils. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. IX, p. 265 ; 1895.

[8] Ed. Buchner, J. Meisenheimer et H. Schade. — Zur Vergärung des Zuckers ohne Enzyme. *Ber. d. deutsch. chem. Ges.*, t. XXXIX, p. 4217 ; 1906.

[9] H. Schade. — Ueber die Vergärung des Zuckers ohne Enzyme. *Zeitschr. f. physikal. Chemie*, t. LVII, p. 1 ; 1906.

— Ueber die Vorgänge der Gärung von Standpunkte der Katalyse. *Biochem. Zeitschr.*, t. VII, p. 299 ; 1908.

[10] H. Sainte-Claire-Deville et H. Debray. — Sur une propriété nouvelle du rhodium métallique. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. LXXVIII, p. 1782 ; 1874.

[11] G. W. Heimrod et P. A. Levene. — Oxydation von Aldehyden in alkalischer Lösung. *Biochem. Zeitschr.*, t. XXIX. p. 31 ; 1910.

[12] E. Rimini. — Ueber eine neue Farbenreaktion des Acetaldehyds. *Chemisch. Centralbl.*, t. LXV (II), p. 277; 1898, d'après *Annali Farmacoter. e Ch.*, p. 249; 1898.

[13] L. Simon. — Un réactif coloré de l'aldéhyde ordinaire. *Bull. Soc. Chim.*, t. XIX, p. 297; 1898.

[14] A. v. Lebedew. — Ueber den Mechanismus der alkoholischen Gärung, (III). *Ber. d. deutsch. chem. Ges.*, t. XLVII, p. 672; 1914.

[15] H. v. Pechmann. — Ueber Osazone. *Ibidem.*, t. XXI, p. 2751; 1888.

[16] G. Pinkus. — Ueber die Einwirkung von Benzhydrazid auf Glucose. *Ibidem.*, t. XXXI, p. 31; 1898.

[17] J. U. Nef. — Dissoziationsvorgänge in der Glycol-Glycerinreihe. *Liebig's Annalen*, t. CCCXXXV, p. 191; 1904.

[18] H. D. Dakin et H. W. Dudley. — The interconversion of α-amino-acids, α-hydroxy-acids and α-ketonic aldehydes. IIe partie. *Journ. of Biolog. Chem.*, t. XL, p. 127; 1913.

[19] A. Wohl. — Die neueren Ansichten über den chemischen Verlauf der Gärung. *Biochem. Zeitschr.*, t, V, p. 45; 1907.

[20] E. Duclaux. — Sur les analogies entre les procès de fermentation et de combustion solaire. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. VII, p. 752; 1893.

[21] Mlle W. Denis. — On the behavior of various aldehydes, ketons and alcohols towards oxidizing agents. *Amer. Chem. Journ.*, t. XXXVIII, p. 561; 1907.

[22] E. Erlenmeyer. — Verhalten der Glycerinsäure und der Weinsäure gegen wasserentziehende Substanzen. *Ber. d. deutsch. chem. Ges.*, t. XIV, p. 320; 1881.

[23] L. Simon. — Action des composés cétoniques dissymétriques sur les amines aromatiques primaires. *Bull. Soc. Chim.*, t. XIII, p. 335; 1895.

[24] F. Framm. — Ueber die Zersetzung von Monosacchariden durch Alkalien. *Pflüger's Arch. f. d. ges. Physiol.*, t. LXIV, p. 575; 1896.

[25] G. W. Heimrod et P. A. Levene. — Die anodische Oxydation der Aldehyde. *Ber. d. deutsch. chem. Ges.*, t. XLI, p. 4443; 1908.

[26] W. Loeb et G. Pulvermacher. — Die Einwirkung von Bleihydroxyd auf Traubenzucker. *Biochem. Zeitschr.*, t. XXIII, p. 10; 1910.

[27] A. Wohl et C. Neuberg. — Zur Kenntnis des Glycerin-Aldehyds. *Ber. d. deutsch. chem. Ges.*, t. XXXIII, p. 3095; 1900.

[28] E. Duclaux. — Sur les transformations chimiques provoquées par la lumière solaire. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CIII, p. 881; 1886.

[29] Ed. Buchner et J. Meisenheimer. — Die Buttersäuregärung. *Ber. d. deutsch. chem. Ges.*, t. XLI, p. 1410; 1908.

[30] Ad. Magnus-Lévy. — Die Oxybuttersäure und ihre Beziehungen zum Coma diabeticum. *Archiv f. exper. Pathol. u. Pharm.*, t. XLII, p. 149; 1899.

[31] E. Börnstein et A. Herzfeld. — Ueber die Oxydation der Lävulose. *Ber. d. deutsch. chem. Ges.*, t. XVIII, p. 3353; 1885.

[32] A. Fernbach et M. Schoen. — L'acide pyruvique, produit de la vie de la levure. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CLVII, p. 1478; 1913

ACTION DES ACIDES SUR LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

(DEUXIÈME MÉMOIRE)

par M. et Mme ROSENBLATT

(Travail du Laboratoire de M. Gabriel Bertrand.)

Dans un travail publié (1) en 1910, nous avons fait connaître les concentrations de divers acides qui paralysent la fermentation alcoolique du saccharose par la levure haute. On voit, dans ce travail, que l'ordre du groupement des acides, rangés d'après leur activité paralysante, présente avec celui de leur force saccharifiante des irrégularités spécifiques. On voit, de plus, que les doses paralysantes sont considérables par rapport à celles qui suffisent, en général, à arrêter l'action des diastases (2). Nous avons alors émis la supposition que la membrane cellulaire de la levure est peu perméable aux acides et protège suffisamment les diastases qu'elle contient contre l'action de ces réactifs.

Depuis lors a paru un mémoire de Johannessohn (3) qui traite un sujet analogue : l'action des acides de la série grasse sur la fermentation alcoolique.

Les résultats de cet auteur ne diffèrent que peu des nôtres, quant à l'ordre du classement des acides par rapport à leur activité paralysante, comme il résulte du tableau suivant :

ROSENBLATT	JOHANNESSOHN
Isovalérique	Formique.
Formique	Isovalérique.
Acétique	Acétique.
Isobutyrique	Isobutyrique.
Propionique	N. butyrique.
N. butyrique	Propionique.

(1) *Bull. Soc. Chim.* (4), t. VII, p. 691, 1910. — *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXV, p. 196, 1910.

(2) GAB. BERTRAND, Recherches sur l'influence paralysante exercée par certains acides sur la lactase. *Bull. Soc. Chim.* (4), t. Ier, p. 1121, 1907. — *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXI, p. 673, 1907.

(3) *Biochem. Zeitschr.*, t. XLVII, II, p. 97, 1912.

Mais ils en diffèrent en ce qui concerne les concentrations moléculaires des doses paralysantes : celles-ci sont, d'après Johannessohn, inférieures aux concentrations trouvées par nous.

L'explication de ces différences d'ordre quantitatif doit être, sans doute, cherchée principalement dans la moindre résistance de la levure employée par Johannessohn.

Des exemples de discordances analogues sont nombreux; ainsi, entre autres, nous pouvons citer les différentes concentrations d'acide sulfurique données par divers auteurs comme suffisantes pour arrêter la fermentation alcoolique: les doses en molécules-grammes par litre sont, d'après Dumas, m/1,63 (pour 5 grammes de levure); d'après Biernacki m/9,8; d'après Bokorny m/490 et d'après nos expériences m/10.

Ce dernier chiffre a lui-même changé au cours de nos recherches, de ce fait que la levure employée par nous était préparée (comme nous l'avons appris dans les derniers mois) avec des moûts auxquels on avait ajouté, à l'époque de nos dernières recherches, une certaine quantité d'acide sulfurique.

La levure s'est alors accoutumée à cet acide, elle est devenue plus résistante et il a fallu employer l'acide sulfurique à la concentration de m/5 au lieu de m/10 pour arrêter complètement la fermentation alcoolique.

Il est évident, d'après les exemples précités, qu'on ne doit pas attribuer aux concentrations observées une valeur absolue en ce qui concerne les différentes races de levure. Ce qu'il faut considérer dans ce genre de recherches biologiques, ce sont les résultats obtenus dans une série d'expériences exécutées avec la même espèce de cellules vivantes ou avec une diastase de la même provenance.

Ayant dernièrement repris nos recherches sur la fermentation alcoolique, nous avons constaté que, si la dose paralysante d'acide sulfurique avait augmenté, celles des acides de la série grasse étaient restées les mêmes qu'en 1910. Nos nouvelles expériences ont été exécutées soit avec la saccharose, soit avec le glucose, d'après notre mode opératoire, ou en nous pla-

çant dans les conditions d'expériences de Johannessohn (1).

Dans le mémoire cité plus haut, Johannessohn indique aussi que certaines doses d'acides gras activent la fermentation alcoolique. La question de l'activation par les acides est intéressante surtout à cause des faits contradictoires publiés par les différents auteurs ; Dumas (2), qui a essayé les acides sulfurique, sulfureux, phosphorique, arsénieux, borique, oxalique, acétique et tartrique, dit que l'addition de l'un de ces acides à faible dose ne hâte ni le commencement de la fermentation, ni sa fin. Quand on en ajoute beaucoup, il y a retard ou arrêt. Kayser (3), en étudiant le rôle des acides tartrique, malique et citrique, trouve que la fermentation marche plus vite dans les moûts neutres que dans les moûts acides, mais que l'action antiseptique des acides n'est pas la même sur toutes les levures.

Par contre, les expériences de Schulz et de ses élèves sur les acides arsénieux, chromique et formique, de Biernacki sur les acides benzoïque, salicylique, sulfurique, pyrogallique et borique, et de Johannessohn sur les acides formique, acétique, propionique, butyrique et isovalérique, indiquent que les faibles doses de ces réactifs ont une action accélératrice sur la fermentation alcoolique.

Pour trancher cette question de l'influence des acides, nous avons repris l'étude de l'action de petites doses des acides et des sels acides suivants : acides chlorhydrique, formique, acétique, propionique, n-butyrique, sulfurique, tartrique, citrique et phosphorique. Parmi les sels, nous avons étudié le sulfate, le phosphate, l'oxalate, le citrate monopotassique, le citrate bipotassique et le tartrate monosodique.

Nous avons trouvé que tous les acides, ainsi que le sulfate monopotassique, n'ont pas d'action favorisante sur la fermentation alcoolique. En opérant avec les doses croissantes de l'un quelconque des acides mentionnés ci-dessus, on n'observe jusqu'à une certaine concentration aucune différence entre la

(1) Il faut remarquer que la méthode polarimétrique employée par Johannessohn ne permet pas de constater avec certitude l'arrêt complet de la fermentation alcoolique. Les petites variations en sucre échappent à l'observation. Il est donc indispensable de se servir pour les dosages de sucre d'une méthode beaucoup plus sensible, par exemple de la méthode de Gab. Bertrand.

(2) *Ann. de Chim. et Phys.*, 5e série, t. III, p. 57, 1874.

(3) *Annales de l'Institut Pasteur*, p. 51, 1896.

quantité de sucre disparu dans le liquide en fermentation additionnée d'acide et entre le liquide témoin. A partir de cette dose limite, l'action défavorable de l'acide commence à se manifester. Par contre, les expériences avec le phosphate, les citrates, le tartrate et l'oxalate ont montré l'existence d'une certaine action favorisante sur la fermentation alcoolique.

Notre mode opératoire était le suivant : des tubes à essai en verre d'Iéna, contenant 10 cent. cubes d'eau pure (témoin) ou de solution acide de concentration convenable et contenant, en outre, 125 milligrammes de glucose pur, ont été additionnés de 100 milligrammes de levure (apportée journellement et toujours de la même provenance). Après deux heures de séjour à + 28 degrés, on a ajouté 1/4 de cent. cube d'acide chlorhydrique concentré dans chaque tube, de manière à arrêter la fermentation. Ensuite on a dosé le sucre restant par la méthode de Gab. Bertrand (1). L'alcool formé a été dosé dans certains cas après distillation par la méthode au bichromate (2). Après deux heures de séjour à + 28 degrés, les tubes témoins accusaient presque constamment une disparition de 30 p. 100 environ de glucose (3).

Les résultats obtenus se divisent en deux séries ; la première comprend les réactifs qui n'ont aucune action favorisante. Ce sont les acides libres et le bisulfate de potassium. Voici les concentrations en molécules-grammes à partir desquelles commence, avec ces réactifs, une action défavorable sur la fermentation.

1° Acide chlorhydrique	m/6.000
— formique	m/5.000
— acétique	m/300
— propionique	m/250
— N. butyrique	m/200
Acide sulfurique	m/6.000
— tartrique	m/1.000
Acide phosphorique	m/5.000
— citrique	m/3.000
2° Sulfate monopotassique	m/2.000

(1) *Bull. Soc. Chim.* (3), t. XXXV, p. 1285, 1906.

(2) Voir la technique dans : *Gab. Bertrand-P. Thomas. Guide pour les manipulations de chimie biologique*, Paris, 2e édition, 1913, H. Dunod et E. Pinat, éditeurs.

(3) C'était un critérium de la constance de l'activité de la levure étudiée.

L'ordre de classement de ces acides est à peu près le même que pour les doses paralysant complètement la fermentation.

La deuxième série comprend les réactifs qui, au contraire des précédents, favorisent la fermentation. Ce sont le phosphate acide de potassium et les sels organiques acides. Voici les concentrations de ces réactifs qui favorisent le mieux la fermentation alcoolique.

Oxalate monopotassique	Optimum	m/200
Citrate bipotassique	—	m/10
— monopotassique	—	m/5
Tartrate monosodique	—	m/4
Phosphate monopotassique	—	m/3

L'augmentation de la quantité de sucre fermenté dans le tube contenant la dose optimale de sel acide comparé avec le tube témoin était de 13 p. 100 environ avec le phosphate et citrate monopotassique, 19 p. 100 avec l'oxalate monopotassique et le tartrate monosodique et 22 p. 100 avec le citrate bipotassique.

D'après les résultats indiqués ci-dessus, nous pouvons conclure que les acides libres étudiés n'ont, à aucune dose, d'action favorable sur la fermentation alcoolique du glucose par la race de levure employée par nous. La fermentation s'est manifestée de la même manière dans les tubes additionnés d'acide (à des doses inférieures à celles indiquées dans le tableau) que dans les tubes témoins.

Il est à remarquer que ces derniers avaient aussi une légère réaction acide, apportée par les 100 milligrammes de levure employée. Cette acidité (1) saturait :

en présence de l'héliantine :
0,01 c.c. NaOH m/10 ou 1 c.c. NaOH m/1.000;
en présence de l'alizarine :
0,01 c.c. NaOH m/10 ou 1 c.c. NaOH m/1.000;
en présence de la phtaléine de phénol et du rouge neutre :
0 c.c. 025 m/10 ou 1 c.c. m/400.

Ce qui représentait une concentration de m/4.000 (titré en présence de phtaléine).

(1) Pour les titrages, on a employé une macération de 10 grammes de levure dans 100 cent. cubes H^2O.

Cette concentration, mesurée à l'électromètre et exprimée en ions-hydrogène, était égale 10^{-3}.

Il est assez curieux de constater que l'introduction de certains cations dans la molécule de l'acide peut contre-balancer et au delà l'action défavorable de l'hydrogène acide sur la fermentation alcoolique.

La discordance existant dans les observations des auteurs sur l'action favorable ou défavorable des acides doit avoir sa cause, soit dans le mode opératoire, qui souvent manque de précision, soit aussi dans la différence d'origine et de race des levures étudiées.

Nous avons déjà dit ce qu'il fallait penser de l'imperfection des méthodes (1). Quant à la race de la levure, elle peut déterminer ou bien une inégale perméabilité de la membrane cellulaire aux réactifs acides, ou bien même une différence de sensibilité des diastases à la réaction du milieu.

L'exemple de la sucrase étudiée par Gabriel Bertrand et nous (2) est une preuve indiscutable du rôle capital de l'origine diastasique. Tandis que les sucrases de levure et d'*Aspergillus* fonctionnent mieux en présence d'une acidité notable vis-à-vis de l'héliantine, la sucrase de Kôji a son optimum d'action en milieu où la concentration en ions-hydrogène est voisine ou même très légèrement inférieure à celle qui correspond à la neutralité, à l'héliantine.

De même que dans nos recherches sur la sucrase de levure, nous avons observé que les doses optima d'acides variaient notablement selon la provenance de la levure.

En associant tous ces phénomènes, on aperçoit la grande importance qu'il faut attribuer aux corrélations qui existent entre la nature spécifique des cellules vivantes ou des ferments solubles et la réaction du milieu.

(1) *Bull. Soc. Chim.* (4), t. VII, p. 691, 1910, et *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXIV, p. 197 et 198, avril 1910.

(2) *Bull. Soc. Chim.* (4), t. XI-XII, 4, p. 176 et 9, p. 464, 1912, et t. XIII-XIV, 5, p. 241, 1913. — *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXVI, p. 321 et 931, 1912, et t. XXVII, p. 366, 1913.

LE TUBERCULEUX PEUT-IL ÉMETTRE DES PARTICULES LIQUIDES RESPIRABLES?

par P. CHAUSSÉ.

(DEUXIÈME MÉMOIRE)

Les acquisitions que nous avons précédemment faites sur la pulvérisation liquide, et sur la pulvérisabilité de la salive et des crachats tuberculeux, nous permettront de discuter la présente question en meilleure connaissance de cause.

Dans l'historique de la théorie de Flügge (1) nous avons indiqué toutes les constatations enregistrées au sujet de l'émission de gouttelettes par le malade. En général, on a mis en évidence la projection de particules liquides à une faible distance du tuberculeux, et Flügge lui-même estime qu'il n'y a guère de danger au delà de 1 mètre ou de 1 m. 50 centimètres. Il résulte de cette manière de voir que cet auteur admet hypothétiquement la respirabilité de gouttelettes relativement volumineuses et qu'il ne semble plus envisager, bien qu'il y ait pensé antérieurement, l'émission possible de particules extrêmement fines, puisque ces dernières seraient certainement transportées beaucoup plus loin.

B. Heymann est, ainsi que nous l'avons déjà fait ressortir, l'auteur des travaux les plus importants sur la contagion par les particules liquides. Les gouttelettes les plus fines qu'il ait observées avaient 30 microns de diamètre; mais, peut-être, ainsi qu'il le suppose, existe-t-il des particules plus fines, susceptibles d'être inhalées. S'il en est ainsi, la thèse de Flügge serait exacte, au moins en partie, mais la preuve en reste tout entière à apporter.

Le problème que nous nous proposons de discuter, sinon de résoudre, est, certes, des plus complexes. Il faut tenir compte

(1) *Revue d'Hygiène et de Police sanitaire* du 20 juin 1913.

des conditions physiques réunies dans l'appareil respiratoire au moment de la toux, de la pulvérisabilité de la salive et des crachats tuberculeux; il est nécessaire de recueillir les particules émises, de les examiner au microscope au point de vue de leur teneur en bacilles et de les mesurer; il est indiqué de recevoir les mêmes particules dans des récipients stériles placés à des distances diverses des malades, et d'inoculer ensuite le contenu de ces récipients pour connaître la distance de projection ; enfin, après avoir tenté de nous rendre compte des chances d'inhalation, nous procéderons à des épreuves de toux artificielle et à d'autres recherches consistant en l'inhalation directe, par le cobaye, de l'air expulsé pendant la toux. Ces dernières investigations nous renseigneront d'une manière définitive, pensons-nous, sur le danger de contagion par les particules liquides.

I

Les conditions physiques nécessaires, pour la pulvérisation fine des mucosités ou de la salive, sont-elles réunies dans l'appareil respiratoire, au moment de la toux ou de la parole?

Les gouttelettes bacillifères pourraient provenir effectivement soit des mucosités, soit de la salive, au moment où l'air traverse ces produits à une forte vitesse. Voyons donc si, en quelque point de l'appareil respiratoire, les conditions nécessaires sont réunies pour diviser les liquides bacillaires en particules respirables.

Nous savons déjà que la viscosité des liquides muqueux s'oppose énergiquement à leur pulvérisabilité, d'après les recherches que nous avons faites avec la salive et les crachats des tuberculeux. [Premier mémoire, ces *Annales*, 25 juin 1914.]

Le total des sections bronchiques est supérieur à la section de la trachée; c'est donc dans ce dernier conduit, et ensuite au niveau du rétrécissement laryngien, que les conditions de vitesse de l'air seraient le plus favorables à la pulvérisation.

Dans des recherches inédites faites avec M. Magne, chef des travaux de physiologie à l'Ecole d'Alfort, nous avons étudié les

conditions physiques réalisées dans les voies respiratoires, pendant la toux. Nous avons d'abord mesuré la quantité d'air expulsée pendant un violent effort de toux et l'avons trouvée égale à 1 litre chez un sujet normal de 1 m. 80 (80 kilogrammes), et à 860 cent. cubes chez un autre sujet normal de 1 m. 60 (60 kilogrammes). La durée et la forme du mouvement de toux ont été enregistrées par plusieurs méthodes. Le temps de la toux forte varie de 25 à 40 centièmes de seconde. La courbe d'expulsion de l'air atteint brusquement un maximum qui est soutenu seulement pendant quelques centièmes de seconde, et qui est suivi d'une chute un peu moins brusque que le début. Après la toux, il y a parfois expulsion lente d'une certaine quantité d'air.

Ces recherches devant être prochainement publiées en détail, nous nous contenterons de dire que la vitesse de l'air dans la trachée, pendant la toux, est comprise entre 5 et 17 mètres par seconde, cette dernière vitesse n'étant atteinte que dans des *efforts violents*. Au moment de la toux, la glotte se dilate sous la poussée de l'air; toutefois, le calibre de cet orifice reste inférieur d'un tiers environ à celui de la trachée; au passage de la glotte, la vitesse de l'air peut donc atteindre environ 25 mètres.

Mais les vitesses maxima ne sont pas celles qui se réalisent couramment chez le malade, car elles ne tarderaient pas, en raison de leur action mécanique, à créer des lésions inflammatoires; ces vitesses ne peuvent être soutenues. La toux habituelle ne met en œuvre que des vitesses trachéales de 5 à 12 mètres, ou des vitesses laryngiennes de 7 à 18 mètres environ.

Chez le tuberculeux, il faut également considérer qu'il y a diminution de la capacité respiratoire et que la toux répétée, par suite de la douleur qui l'accompagne, est le plus souvent d'intensité modérée.

Admettons, du reste, que les vitesses maxima de 17 et de 25 mètres soient réalisées. Nous avons vu que ces vitesses ne suffisent pas à effectuer la pulvérisation liquide aux dépens de la salive et des crachats. Nous devons également remarquer que l'appareil laryngien n'est pas disposé, pour la pulvérisation du muco-pus, d'une manière aussi propice que notre pulvéri-

sateur simple : le mucus, soulevé par l'air, lorsqu'il arrive dans la trachée et le larynx, est projeté simplement dans la cavité bucco-pharyngienne. Si, dans nos expériences sur la pulvérisabilité de la salive et des crachats, nous sommes arrivé à faire détacher une petite quantité de particules, grâce à des vitesses de 35, 50, 80 mètres par seconde, en procédant par barbotage, c'est que le produit bacillaire ne pouvait être chassé; il retombait toujours en petite quantité et sous une faible épaisseur, sur le jet d'air; d'autre part, l'air étant débité par un tube de très faible diamètre (1 à 1/10 de millimètre carré de section), tandis que la trachée et le larynx ont respectivement, en moyenne, 250 et 180 millimètres carrés de section, soit 300 à 2.500 fois plus, les contacts d'une même quantité d'air étaient beaucoup plus intimes, dans nos expériences de barbotage, et les chances de contamination de cet air bien plus élevées; enfin les vitesses maxima de l'air dans chaque mouvement de toux n'existent que pendant quelques centièmes de seconde! Cependant quelques résultats positifs n'ont été obtenus, par barbotage de l'air dans les crachats et la salive, qu'à la condition de faire passer dans ces liquides un grand volume d'air; et nous avons bien observé que toujours les produits virulents ont été brassés et agités beaucoup plus qu'ils ne le sont dans les conditions naturelles.

Dans les voies respiratoires et dans le poumon malade, c'est surtout la ventilation superficielle qui intervient; or celle-ci n'effectue aucune division; elle projette seulement la masse muco-purulente hors des voies respiratoires. La pénétration du crachat par l'air n'est presque pas réalisée et elle ne peut avoir lieu que dans la profondeur, par un petit volume de gaz et à une faible vitesse.

Pour nous rendre compte de la manière dont se comporte l'appareil trachéo-laryngien, lors de la toux, nous avons pris un tube de verre de 18 millimètres de diamètre intérieur et l'avons coudé en trois endroits. Le coude supérieur, présentant un rétrécissement, simulait le larynx; la partie inférieure de ce tube était coudée à angle droit (fig. 1) et un peu relevée à son extrémité. Mettant dans ce tube du mucilage coloré préparé avec de la graine de lin, et soufflant par secousses, à l'aide d'un gros tube de caoutchouc adapté sur l'extrémité inférieure,

le segment médian étant tenu vertical, nous avons tenté de recueillir, à l'orifice supérieur, des particules fines. Le tube ainsi préparé donnait exactement le bruit de la toux grasse et profonde, mais le produit mucilagineux, de consistance cependant un peu inférieure à celle du muco-pus bronchique, ne pouvait être divisé finement : il était toujours projeté en masse ou en grosses gouttes, de la même manière que les crachats.

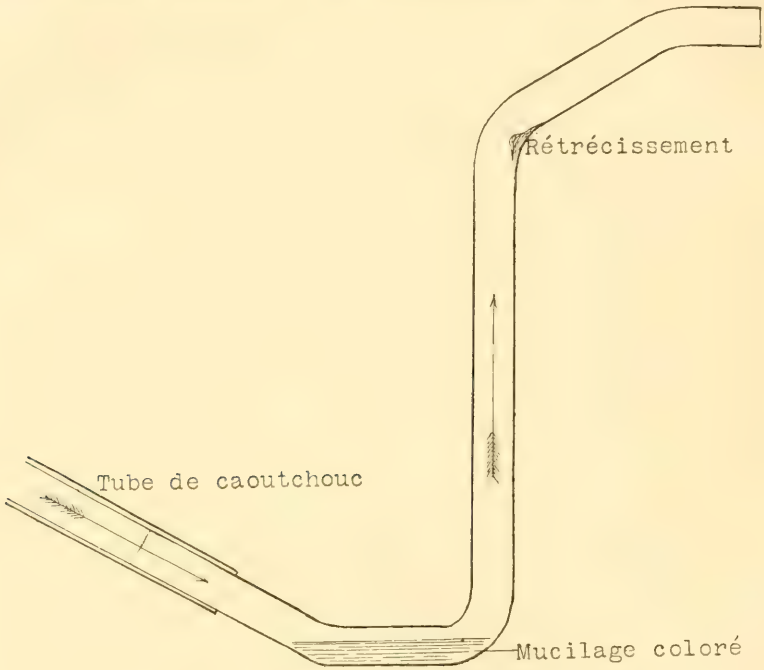


Fig. 1. — Tube coudé, en verre, réalisant le schéma des voies respiratoires supérieures, et permettant de voir l'agitation d'un liquide très visqueux, dans des conditions comparables à celles de la toux.

Il nous paraît donc certain que *les conditions physiques nécessaires ne sont pas réunies dans les voies respiratoires, au moment de la toux, pour la division fine des mucosités.* A plus forte raison, ces conditions ne sont pas réunies dans la respiration normale, la parole ou le chant, les vitesses aériennes mises en œuvre dans la trachée et le larynx étant alors de 5 à 10 fois plus faibles que celles dont il vient d'être question.

La cavité bucco-pharyngienne, beaucoup plus large, ne pré-

sente pas de disposition plus propice à la formation des gouttelettes fines aux dépens des mucosités ou du liquide buccal. Sous l'influence des vibrations dont elle est animée, la luette pourrait donner quelques gouttes ou gouttelettes; cette possibilité sera examinée plus loin et résolue par d'autres expériences.

Les cavités nasales et les narines ne contiennent en général qu'un produit muqueux non virulent ou peu virulent; et, au moment de la toux, elles ne reçoivent qu'une portion de l'air expulsé.

C'est surtout dans la cavité buccale qu'il faut rechercher s'il y a production de gouttelettes microscopiques; ce point sera également examiné dans les pages suivantes.

II

Examen microscopique et mensuration des gouttelettes projetées a l'occasion de la parole, de la toux et du crachement.

C'est au niveau des lèvres, alternativement rapprochées ou éloignées, et frappées par l'air chassé du poumon, au moment de la toux, de la parole ou du crachement, qu'il pourrait y avoir production de gouttelettes fines.

Pour nous rendre compte des caractères de la pulvérisation obtenue dans ces divers actes, car il est évident qu'on constate parfois, à l'œil nu, la projection de gouttelettes, nous avons employé deux méthodes.

I. **Méthode chimique.** — Nous avions le choix entre diverses réactions colorées inoffensives pour l'opérateur; nous avons opéré avec celle du tannin sur le fer.

Ayant imprégné une feuille de papier blanc avec une solution de sulfate ferrique, nous l'avons mise sécher à l'étuve. Cette feuille étant ensuite retirée et fixée sur un support, nous nous rincions la bouche avec une solution de tannin et procédions à des essais, à faible distance (30 centimètres), en face de la feuille de papier, parlant, toussant et crachant; nous avons fait faire les mêmes épreuves à plusieurs personnes.

Toute particule liquide reçue par la feuille de papier se dessinait en noir sans augmentation de dimensions, car le papier utilisé ne buvait pas; nous pouvions ensuite examiner ce papier au microscope et mesurer les gouttelettes s'il en existait. Voici les résultats de ces examens.

1° *Pendant la parole.* — Il y a rarement projection de gouttelettes; lorsque cette projection a lieu, il s'agit de particules volumineuses dont la chute est instantanée et l'inhalation impossible.

2° *Pendant la toux.* — Au moment de la toux, il y a très rarement projection de gouttelettes si les lèvres sont écartées, ce qui est le cas ordinaire, mais il y a émission d'un petit nombre de particules *si les lèvres se touchent légèrement*, de telle sorte que l'air, comprimé un instant dans la bouche, les sépare en projetant et divisant le liquide qui les imbibe. Le diamètre des gouttelettes formées varie de *30 microns à 5 ou 6 millimètres.* Sur ce point, nous confirmons donc, partiellement, les faits constatés par B. Heymann, mais en ajoutant que le contact des lèvres est nécessaire à cette pulvérisation; si les lèvres sont tant soit peu écartées au début de l'acte, l'émission est minime ou nulle.

Dans tous les cas, il importe de remarquer que les gouttelettes les plus fines, parmi celles-ci, sont *à la limite de la respirabilité. Ce ne sont pas des vésicules*; la formation de ces dernières est exceptionnelle, et les particules ayant un vide central sont plus volumineuses que les plus fines des précédentes.

L'émission des particules les plus fines ne peut avoir lieu pendant la parole, par le même mécanisme, parce que la force expiratoire mise en jeu est beaucoup plus faible, même au moment de la prononciation des consonnes.

3° *Pendant le crachement.* — C'est pendant le crachement que la production des gouttelettes est la plus abondante, *à la condition que celui-ci soit effectué du bout des lèvres.* Le mécanisme de division de la salive est donc le même que précédemment, et, dans ces conditions, le diamètre des particules est identique : il va de 30 microns à plusieurs millimètres.

L'acte qui consiste à expulser les grosses mucosités avec lenteur, tel qu'il est habituellement exécuté, ne peut donner lieu à aucune pulvérisation fine.

II. Recherches faites avec les phtisiques. — Nous avons essayé de recueillir les particules liquides que le malade peut émettre à l'occasion de la parole, de la toux et du crachement, de les fixer et de les examiner au microscope.

Pour recevoir ces particules nous avons construit une boîte métallique plate de 15 sur 20 centimètres, ayant 2 centimètres d'épaisseur. Sur l'une des faces de cette boîte pouvait être fixée une plaque de verre de 13 sur 18 centimètres. Dans la boîte, nous versions de l'eau chauffée à une température voisine de l'ébullition, de telle sorte que cette réserve de calorique portait la lame de verre à 80 degrés environ.

La boîte ainsi préparée étant placée en face de la bouche du malade, à une distance de 15 centimètres, celui-ci parlait, toussait ou crachait (fig. 2) ; les gouttelettes projetées tombaient sur le verre et se fixaient instantanément, par suite de l'évaporation de l'eau, avec leur forme et leurs dimensions. Nous pouvions ensuite colorer ces particules, les mesurer et reconnaître leur contenu au microscope.

1° *Pendant la parole.* — Pendant la parole nous avons constaté qu'il n'y a ordinairement aucune émission de particules. Par exception, il peut y avoir projection d'une ou de plusieurs gouttelettes de fortes dimensions, dont la composition est la même que celle indiquée ci-dessous, et qui peuvent contenir des bacilles ; mais ces particules n'ont pas un intérêt pathogénique immédiat : elles sont trop volumineuses et ne peuvent être inhalées qu'après dessiccation si elles sont à nouveau pulvérisées.

2° *Pendant la toux naturelle.* — Après 30 à 40 efforts de toux, la lame de verre ne récolte qu'un très faible nombre de particules. En faisant cette épreuve chez trois malades dont les expectorations étaient particulièrement riches en bacilles, et qui crachaient abondamment (ils sont morts peu de temps après), nous avons vu que les dimensions des gouttelettes projetées varient de 30 à 3.000 micromillimètres environ. Morphologiquement il s'agit de sphérules ; une seule fois nous avons trouvé une vésicule ayant 36 micromillimètres de diamètre et dépourvue de bacilles.

Ces gouttelettes sont composées de salive et de mucus ; elles contiennent des cellules épithéliales desquamées, ordinairement

d'origine buccale ou pharyngienne, et des microbes communs

Fig. 2. — La boîte plate que le malade tient devant sa bouche porte une plaque de verre chauffée à 80-90 degrés, sur laquelle viennent se fixer les particules liquides projetées pendant la parole, la toux ou le crachement.

de la bouche ; nous n'avons pu y découvrir une seule fois un

bacille tuberculeux, parce que ces derniers sont relativement peu nombreux dans la salive, et parce que l'émission de gouttelettes est minime.

En résumé, à l'occasion de la toux naturelle, la production des gouttelettes est très faible ; la plupart de ces particules ont de fortes dimensions (60 microns et au-dessus) et il est difficile d'y découvrir des bacilles de Koch au microscope, même chez les malades dont les expectorations sont riches en ces agents pathogènes.

3° *Pendant le crachement.* — Nous venons de constater qu'il y a deux manières de cracher, dont le pouvoir de division est différent : 1° l'une qui consiste à laisser choir doucement dans le récipient, sur le sol, ou dans le mouchoir, les expectorations apportées dans la bouche par un effort de toux ; 2° l'autre qui met en œuvre le mécanisme de la pulvérisation labiale, les lèvres étant rapprochées pendant cet acte, et recevant sur leurs bords mouillés de liquide une poussée aérienne brusque.

Le tuberculeux emploie presque exclusivement le premier mode et il est impossible, dans ces conditions, de recueillir, en plaçant notre appareil près de son orifice buccal, la moindre parcelle salivaire.

Le crachement labial, plus violent, est rarement employé ; par sa répétition il aurait d'ailleurs l'inconvénient d'irriter les lèvres en raison de la friction qu'il exerce sur elles. Nous avons voulu néanmoins nous rendre compte de sa puissance de division, et, pour cela, nous avons demandé aux malades précédents de cracher volontairement, de cette manière, sur nos lames de verre chauffées.

Les particules ainsi récoltées sont assez nombreuses, et elles sont de l'ordre de celles recueillies, en quantité beaucoup plus faible, pendant la toux naturelle. Il était utile de les fixer et de les examiner après coloration.

Nous avons ainsi constaté que ces gouttelettes ont de 30 à 3.000 micromillimètres, comme précédemment ; les plus nombreuses sont celles de 80 à 150 micromillimètres ; il y en a seulement quelques-unes de 35 et de 30 micromillimètres, ces dernières étant tout à fait exceptionnelles.

Selon le volume de ces gouttelettes on y décèle un nombre variable de cellules épithéliales, de microbes banaux et de leu-

cocytes : elles ne contiennent qu'un nombre relativement faible de bacilles tuberculeux. Ce sont toujours des sphérules.

Quant à la teneur en bacilles et aux dimensions, voici ce que donne l'examen microscopique des gouttelettes prises successivement au hasard.

Diamètre	Nombre de bacilles
150 micromillimètres	1
100 micromillimètres	1
220 micromillimètres	0
100 micromillimètres	0
130 micromillimètres	0
60 micromillimètres	0
140 micromillimètres	3 (accolés).
180 micromillimètres	0
70 micromillimètres	0
75 micromillimètres	0
90 micromillimètres	0
60 micromillimètres	1
300 micromillimètres	0
260 micromillimètres	0
65 micromillimètres	0
300 micromillimètres	15 (dans un filament muqueux ; quelques-uns sont isolés).
110 micromillimètres	0
90 micromillimètres	0
115 micromillimètres	0
160 micromillimètres	0
85 micromillimètres	0
70 micromillimètres	0

Chez le malade ainsi examiné les bacilles étaient beaucoup plus abondants que chez la généralité des phtisiques. N'oublions pas non plus qu'il s'agit ici d'une *division labiale volontaire*, exécutée spécialement dans le but de produire des gouttelettes.

Nous nous résumerons en disant que le tuberculeux ne produit : 1° à l'occasion de la parole aucune particule respirable ; 2° pendant la toux qu'un très faible nombre de gouttelettes ; parmi celles-ci, une très minime proportion se trouvent à la limite de la respirabilité, mais elles ont d'autant moins de chances de contenir des bacilles qu'elles sont plus fines ; 3° pendant le crachement lent, habituel, il n'y a aucune émission de gouttelettes ; 4° pendant le crachement labial, généralement non usité, il peut y avoir formation d'un plus

grand nombre de gouttelettes que pendant la toux, les autres caractères de ces particules étant les mêmes.

L'inhalation des plus fines de ces particules apparaît possible *si un certain nombre d'autres conditions indispensables sont précisément réunies au moment de leur émission.*

III

Exposition, a quelque distance du phtisique qui tousse, de récipients contenant un liquide stérile, et inoculation de ce liquide a des cobayes.

Les élèves de Flügge n'ont reconnu la projection de particules liquides qu'à une faible distance du tuberculeux ; dans la thèse que nous voulons discuter il était indiqué de rechercher, par la méthode qui consiste à recueillir les gouttelettes et à les inoculer, s'il y a vraiment émission de semblables particules, et, dans l'affirmative, à quelle distance elles sont transportées.

Dans ce but nous avons fait des épreuves avec 12 malades dont les expectorations, examinées à diverses reprises, et notamment chaque fois, au cours des expériences, étaient riches en bacilles. Il est utile de mentionner que plusieurs de ces malades avaient en outre de la laryngite tuberculeuse (Bac..., Dum..., Daut..., Péj..., Led..., Bill...) témoignant de la virulence extrême des mucosités. La présence de plaies laryngiennes paraît éminemment favorable à la dispersion de particules bacillaires au moment de la toux.

Voici quelques brefs renseignements concernant l'état de chacun de ces malades, tous tuberculeux cavitaires :

1° Bon..., trente-huit ans, lésions pulmonaires et osseuses ; environ 50.000 bacilles par milligramme de crachats ;

2° Bac..., quarante ans ; lésions pulmonaires anciennes ; laryngite bacillaire datant de 6 mois ; environ 100.000 bacilles par milligramme de crachats ;

3° Dum..., cinquante-neuf ans ; fortes lésions pulmonaires fibro-caséeuses ; laryngite spécifique ; environ 40.000 bacilles par milligramme ; mort 30 jours après ;

4° Daut..., cinquante-huit ans ; très fortes lésions pulmonaires et laryngiennes ; environ 100.000 bacilles par milligramme ; mort 18 jours après ;

5° Bill..., cinquante ans ; très vieilles lésions thoraciques avec emphysème ; environ 60.000 bacilles par milligramme de crachats ;

6° Fav..., trente-deux ans ; tuberculose cavitaire des deux sommets ; environ 25.000 bacilles par milligramme de crachats ;

7° Led..., trente-sept ans ; mêmes lésions thoraciques ; environ 50.000 bacilles par milligramme de crachats ;

8° Danel..., dix-huit ans ; tuberculose pulmonaire à évolution rapide ; environ 125.000 bacilles par milligramme de crachats ; décédé 25 jours plus tard ;

9° Car..., quarante-cinq ans ; fortes lésions thoraciques ; environ 50.000 bacilles par milligramme de crachats ;

10° March..., quarante-cinq ans ; même état ; environ 15.000 bacilles par milligramme de crachats ;

11° Sor..., trente-cinq ans ; environ 80.000 bacilles par milligramme de crachats ; même état pulmonaire ;

12° Péj., quarante-huit ans : vieilles cavernes pulmonaires ; laryngite de même nature ; environ 60.000 bacilles par milligramme de crachats.

Les quatre premières expériences ont consisté à faire asseoir les malades devant une table longue de $2^{m},50$, sur laquelle étaient posées, à 50 centimètres, 1 mètre, $1^{m},50$ et 2 mètres, des boîtes de Petri contenant de l'eau bouillie. Ces malades toussaient selon leurs besoins, dans la direction des boîtes. Un seul malade toussait à chaque expérience, pendant une demi-heure environ, puis il se retirait ; les boîtes, laissées au repos dans la salle pendant une seconde demi-heure, étaient ensuite inoculées séparément, chacune à trois cobayes. Quelques heures plus tard, ou le lendemain, avec un nouveau matériel stérilisé, nous procédions à une autre expérience.

Les huit autres épreuves ont été faites à l'aide de notre caisse à inhalation de 86 litres. Sur l'un des côtés verticaux de cette boîte était adapté un large tube muni d'un pavillon dans lequel toussait le malade ; une seconde ouverture, dans la même paroi, permettait à l'air de sortir à mesure qu'une nouvelle quantité de ce gaz, provenant de la toux, pénétrait dans le récipient (voir fig. 4 et 5). Deux boîtes de Petri contenant de l'eau stérile se trouvaient dans la caisse à inhalation : l'une tout auprès du tube de rentrée de l'air, et à 30 centimètres environ de la bouche du malade ; l'autre à l'extrémité opposée, soit à 80 centimètres à peu près de la bouche du phtisique.

Après chaque expérience, le liquide des boîtes de Petri fut inoculé à des cobayes, à raison de 4 cobayes par récipient.

Sur ces huit expériences 4 ont été pratiquées en faisant tousser un seul malade ; dans les quatre autres nous avons fait tousser successivement 2, 3, 4 et 5 tuberculeux sans changer les boîtes de Petri, et c'est le liquide exposé à ces causes multiples de pollution qui a été inoculé.

Les huit dernières expériences avaient un autre but plus important : des cobayes étaient soumis simultanément à l'inhalation de l'air expiré ; le résultat de cet autre genre d'épreuves sera rapporté plus loin.

Le tableau récapitulatif ci-joint permet de saisir d'un seul coup d'œil les résultats des recherches effectuées par inoculation.

TABLEAU RÉCAPITULATIF

NUMÉROS des expériences	NOMS des malades (1)	NOMBRE des efforts de toux	DISTANCE : 0 m. 50			DISTANCE : 1 m.			DISTANCE : 1 m. 50			DISTANCE : 2 m.		
			Boîtes de Petri	Cobayes inoculés	Cobayes tubercul.	Boîtes de Petri	Cobayes inoculés	Cobayes tubercul.	Boîtes de Petri	Cobayes inoculés	Cobayes tubercul.	Boîtes de Petri	Cobayes inoculés	Cobayes tubercul.
1	Bon.	50	1	3	0	1	3	0	1	3	0	1	3	0
2	Bac.	30	3	9	1	1	3	0	1	3	0	1	3	0
3	Dum.	40	1	3	1	1	3	0	1	3	0	1	3	0
4	Dant.	120	1	3	0	1	3	0	1	3	0	»	»	»
	Totaux.	240	6	18	2	4	12	0	4	12	0	3	9	0

			DISTANCE : 0 m. 30			DISTANCE : 0 m. 80			
			Boîtes de Petri	Cobayes inoculés	Cobayes tubercul.	Boîtes de de Petri	Cobayes inoculés	Cobayes tubercul.	
5	Bon.	100	1	3	0	1	3	0	Pour les expériences 5 à 12 inclusivement les malades ont toussé dans le pavillon de la caisse de 86 litres, dans laquelle se trouvaient les boîtes de Petri.
6	Bac.	30	1	3	0	1	3	0	
7	Dum.	50	1	3	0	1	3	0	
8	Dant.	150	1	3	0	1	3	0	
9	Sor. 53 Péj. 114		1	4	0	1	4	0	
10	Bon. 80 Danel. 80 March. 90		1	4	0	1	4	0	
11	Bon. 110 Bill. 150 Fava. 20 Led. 50		1	4	0	1	4	0	
12	Danel. 70 Bill. 120 Car. 103 Bon. 110 Péj. 100		1	4	0	1	4	0	
	Totaux.	1.250	8	28	0	8	28	0	

(1) Tous ces noms sont modifiés.

En résumé 12 *malades ont toussé* 1490 *fois en tout, devant* 33 *boîtes de Petri* ; 107 *cobayes ont été inoculés avec le liquide de ces récipients* ; *sur ce nombre*, 2 *animaux inoculés avec le liquide recueilli à* 50 *centimètres de la bouche des malades Bac..., et Dum..., sont devenus tuberculeux*. Il faut également noter que, dans les deux cas de virulence constatée, 3 cobayes furent inoculés et un seul devint tuberculeux.

Ces expériences nous permettent donc de conclure qu'*il n'y a pas de projection de particules extrêmement fines, au moment de la toux, car celles-ci seraient transportées à plus de* 50 *centimètres*; étant donné ce petit nombre de résultats positifs, dans les conditions ci-dessus, et la courte distance de projection, nous pouvons dire que *c'est seulement par exception qu'une gouttelette assez volumineuse est émise.*

Quant à la distance de projection, nous sommes donc entièrement d'accord avec Flügge et ses élèves, mais nous devons logiquement aboutir à une interprétation différente des faits observés. Il n'est plus permis de croire, avec Flügge et Cornet à la fois, que le tuberculeux qui tousse donne naissance à un nuage de gouttelettes dont les unes, de l'avis de Flügge seulement, restent longtemps suspendues; jusqu'ici *il nous paraît y avoir tout au plus émission de quelques unités non transportables et dont la respirabilité est douteuse.*

IV

Sur les chances d'inhalation des particules les plus fines, émises exceptionnellement, pendant la parole, la toux ou le crachement.

Dans les expériences faites par crachement, avec l'intention de diviser le liquide buccal sur les lèvres, nous avons constaté qu'il est possible de produire un petit nombre de gouttelettes de 30 micromillimètres. Le tuberculeux ne pourrait-il émettre parfois une minime quantité de semblables particules, et, s'il en est ainsi, quelles chances celles-ci auraient-elles d'être inhalées et d'être pathogènes?

Nous savons que des gouttelettes de ces dimensions sont à la

limite de la respirabilité ; ce sont des particules dont on ne peut dire qu'elles ne peuvent être inhalées, mais, à cause de leurs dimensions, leur pouvoir pathogène est très restreint. Essayons donc d'apprécier quelles peuvent être les chances de transmission de la maladie par de telles gouttelettes :

1° Leur nombre est très faible ; nous n'avons pu les observer qu'en les produisant volontairement ;

2° En général, le tuberculeux s'applique à expectorer doucement et, dans tous les cas, le dernier temps de l'expulsion, le temps labial, est effectué avec lenteur ;

3° On constate *de visu* que la salive est très visqueuse, filante, adhérente aux lèvres, très difficilement pulvérisable ;

4° Si des gouttelettes fines se forment, c'est aux dépens du liquide buccal qui est de 100 à 100.000 fois moins riche en bacilles que les crachats ; la très grande majorité de ces gouttelettes fines ne contiennent aucun bacille ;

5° Si de telles particules, en les supposant bacillaires, se présentaient aux orifices respiratoires, elles n'auraient que peu de chances d'arriver aux alvéoles, d'après ce que nous avons acquis sur la transportabilité et la respirabilité (1) ; or, elles ne peuvent être pathogènes qu'à la condition d'atteindre les vésicules pulmonaires ;

6° Que représente cette production minime à côté du nombre invraisemblable de particules que nous mettons en œuvre pour réaliser la tuberculose expérimentale par inhalation ? Chaque milligramme de liquide pulvérisé artificiellement donne au moins 100.000 gouttelettes ; et, d'une hauteur de $2^{m},20$, après 1 minute, il ne reste plus dans l'atmosphère de particules ayant plus de 30 micromillimètres.

7° Mais encore, pour que l'inhalation ait lieu, il faut que les dites particules soient aspirées avec une certaine force ; le faible volume d'air inspiré à chaque fois (400 à 600 cent. cubes), à une vitesse peu élevée, n'exerce une aspiration sensible que tout auprès de la bouche et des narines, à quelques centimètres au plus ; pour pénétrer dans les premières voies respiratoires les particules devraient donc être projetées directement, au moment de la toux et au moment d'une inspi-

(1) *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 24 février et 25 mars 1913.

ration de la personne voisine du malade, en face des orifices respiratoires de celle-ci, conditions qui seront rarement réalisées.

Pour ces raisons théoriques et expérimentales, *la contagion naturelle par les particules liquides nous paraît, dès maintenant, très difficilement réalisable*; pour être plus complètement édifié, il est nécessaire de procéder à d'autres recherches avec les crachats bacillaires et avec les malades.

V

Épreuves de toux artificielle avec des crachats bacillaires.

L'une de nos dernières méthodes de recherche a consisté en la réalisation d'un dispositif en verre, dans lequel nous mettions des crachats riches en bacilles, et destiné à imiter si possible les conditions d'agitation des mucosités dans la toux du phtisique ; cette imitation était obtenue en faisant arriver sur les crachats un courant aérien suffisamment rapide. C'est ce que nous appelons l'épreuve de la toux artificielle.

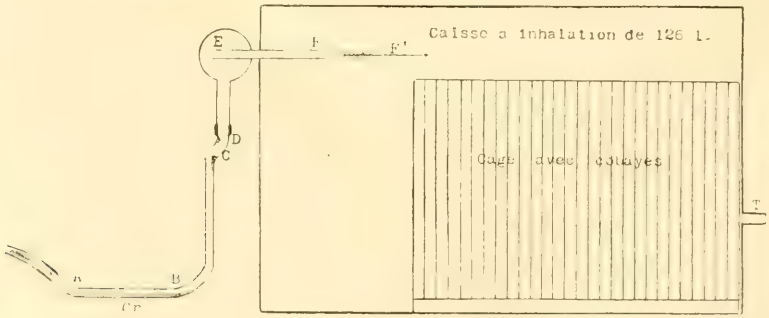


Fig. 3. — Coupe verticale schématique de la caisse 126, à inhalation, disposée pour l'épreuve de la toux artificielle. Cr : crachats bacillaires dans le tube horizontal AB; CD : double coudure destinée à favoriser l'agitation des mucosités; EF : tube horizontal conduisant dans la caisse l'air qui a été au contact des crachats; T : tube de décompression; à gauche, en A, est adapté un tube de caoutchouc par lequel on souffle par secousses.

Dans ce but nous avons pris un tube de verre de 14 millimètres de diamètre intérieur, long d'environ 50 centimètres, que nous avons coudé en quatre endroits de la façon indiquée

sur la figure ci-contre, en A, B, C et D. Sur ce tube nous avons ajusté un ballon renversé, traversé lui-même par un tube de 14 millimètres, EF, ouvert aux deux extrémités (voir fig. 3); le raccord entre ces deux pièces fut exécuté d'une manière hermétique à l'aide de cire à cacheter.

Les coudures C et D correspondaient schématiquement aux rétrécissements laryngien et bucco-pharyngien; à leur niveau, la lumière du conduit était diminuée par la flexion qui déterminait intérieurement à chaque angle interne un relief linéaire mousse analogue à une corde vocale.

Exp. I. — Pour effectuer cette expérience nous avons mis dans le tube, en Cr, 25 grammes de crachats bacillaires tels qu'ils sont expectorés; leur teneur était de 63.500 bacilles par milligramme. Du côté A était adapté un long tube de caoutchouc, large de 14 millimètres. Le tube EF pénétrait par son extrémité libre dans notre caisse à inhalation de 126 litres; cette dernière contenait 8 cobayes.

La toux artificielle fut obtenue en soufflant 100 fois, très fortement et par secousses, dans le tube de caoutchouc. La quantité d'air expulsée par le tube était d'environ 1.200 cent. cubes à chaque fois, en un quart de seconde, ce qui donne une vitesse de 30 mètres par seconde, et au total 120 litres d'air.

A chaque introduction d'air nous constations que les crachats étaient projetés sur le tube EF: l'air ayant subi un contact violent avec les mucosités se rendait ensuite dans la caisse à inhalation. A cause de la disposition réalisée les mucosités ne pouvaient être entraînées en masse; elles retombaient aussitôt après leur projection dans la partie AB, d'où elles étaient à nouveau chassées par l'air.

A la fin de l'épreuve, qui dura environ 5 minutes, les crachats, agités comme il vient d'être dit, étaient complètement homogénéisés, ce qui n'a pas lieu dans les voies respiratoires du phtisique sous l'action de la toux. L'expérience fut donc plus sévère que dans les conditions naturelles.

Les cobayes ont inhalé pendant 3 heures 45 minutes, l'air ayant frappé les crachats. L'un des animaux périt prématurément d'affection intercurrente; un autre mourut après 24 jours, temps suffisant pour le développement des tubercules, et fut reconnu indemne; les six autres, sacrifiés 37 jours après l'inhalation, *étaient parfaitement sains.*

Exp. II. — Effectuée avec le même appareil et les expectorations d'un autre malade; ces expectorations contenaient 71.000 bacilles par milligramme. Les conditions expérimentales furent les mêmes que précédemment.

Les 8 cobayes exposés à l'infection restèrent bien portants; sacrifiés après 34 et 35 jours, *ils étaient indemnes de tuberculose.*

Exp. III. — Même dispositif et même façon d'opérer avec les crachats d'un troisième malade; le produit contenait 62.000 bacilles par milligramme.

Les 8 cobayes ayant inhalé furent tués après 38 jours; *aucun d'eux n'était atteint de tuberculose.*

Exp. IV. — Même matériel et même méthode avec les crachats d'un quatrième phtisique; la richesse bacillaire de ces expectorations était de 90.000 par milligramme.

Sacrifiés 35 jours après l'expérience *les 8 cobayes utilisés n'étaient pas tuberculeux.*

En résumé, *sur 31 cobayes ayant inhalé l'air qui a barboté dans des crachats bacillaires provenant de 4 malades éminemment contagieux,* les conditions étant plus sévères que celles réalisées pendant la toux, *aucun animal n'est devenu tuberculeux.* En d'autres termes, sous l'influence d'un brassage énergique par l'air, les mucosités n'ont laissé détacher aucune particule liquide respirable.

VI

Inhalation directe, par le cobaye, de l'air expiré par des phtisiques, au moment de la toux.

Il y a une trentaine d'années, un médecin français, Giboux (1), avait fait inhaler à deux lapins l'air expiré par des tuberculeux : cet auteur rapporte avoir communiqué la tuberculose par ce moyen.

Quelques années plus tard, Cadéac et Mallet (2), recueillaient dans un ballon de 40 à 50 litres, de 20 à 25 litres de l'air expiré par des tuberculeux; ils achevaient le gonflement avec de l'air atmosphérique et donnaient le tout à inhaler à des lapins; ces animaux restèrent bien portants.

Ces expériences anciennes ne sauraient autoriser des conclusions fermes. Le lapin convient mal pour ces recherches, et cependant Giboux l'aurait tuberculisé (?). Si les sujets de Cadéac et Mallet sont restés indemnes, on peut et l'on doit objecter pareillement que le lapin est trop peu sensible aux petites doses de virus tuberculeux; mais il y a lieu de formuler une objection plus importante : c'est que, durant les manœuvres de remplissage des ballons, pendant le temps employé pour le transport et les manipulations diverses, l'air avait le temps de se débarrasser des particules bacillaires qu'il

(1) *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences,* 1882.
(2) *Revue de Médecine,* 1887.

pouvait contenir au moment de son émission, et cela par simple dépôt; les résultats négatifs ainsi obtenus étaient donc sans valeur. Enfin, si l'air expiré dans l'acte physiologique ne contient pas le virus tuberculeux, il ne peut en résulter que le gaz rejeté pendant les efforts de toux soit également inoffensif, les conditions mécaniques réalisées dans les voies respiratoires étant toutes différentes.

En plaçant une cage contenant des cobayes à proximité de la bouche du malade, B. Heymann rapporte avoir obtenu l'infection de quelques sujets, mais on ne saurait dire si cela est dû aux particules liquides inhalées directement ou à des poussières provenant de la dessiccation de ces particules, ou du malade lui-même.

On voit donc que la question de la nocivité de l'air rejeté par le tuberculeux reste tout entière à élucider. Malgré certaines difficultés pratiques, nous avons cru que, pour établir nos conclusions, il était indispensable d'expérimenter avec le malade.

Pour savoir si le tuberculeux expire, au moment de la toux, de l'air chargé de particules liquides respirables, il nous a semblé que la meilleure méthode consiste à recueillir cet air dans un récipient où se trouvent *des cobayes qui inhaleront immédiatement le gaz suspect.*

Dans ce but nous avons choisi des malades très contagieux. Sur notre caisse à inhalation de 86 litres dont il a déjà été question, nous avons adapté à l'un des bouts un tube de 7 centimètres de diamètre portant extérieurement un pavillon large de 20 centimètres (voir fig. 4 et 5 ci-contre). Sur le même côté que ce pavillon était fixé un tube de décompression T, de 25 millimètres de largeur. La caisse étant fermée nous avons vérifié que, quand on toussait dans le pavillon, l'air pénétrait à l'intérieur; pour s'en convaincre, il suffisait de mettre une flamme en face de l'orifice T, et on constatait qu'à chaque effort de toux cette flamme était fortement soufflée; la même vérification fut faite au cours de chacune des expériences qui suivent.

Il convient encore de remarquer qu'avec cette disposition, l'air rentrant par le pavillon et le tube qui le prolonge, est obligé de faire le tour de la boîte pour atteindre le tube de décompression T; il se mélange donc chaque fois à la masse

d'air contenue dans la caisse et cette quantité d'air destiné à

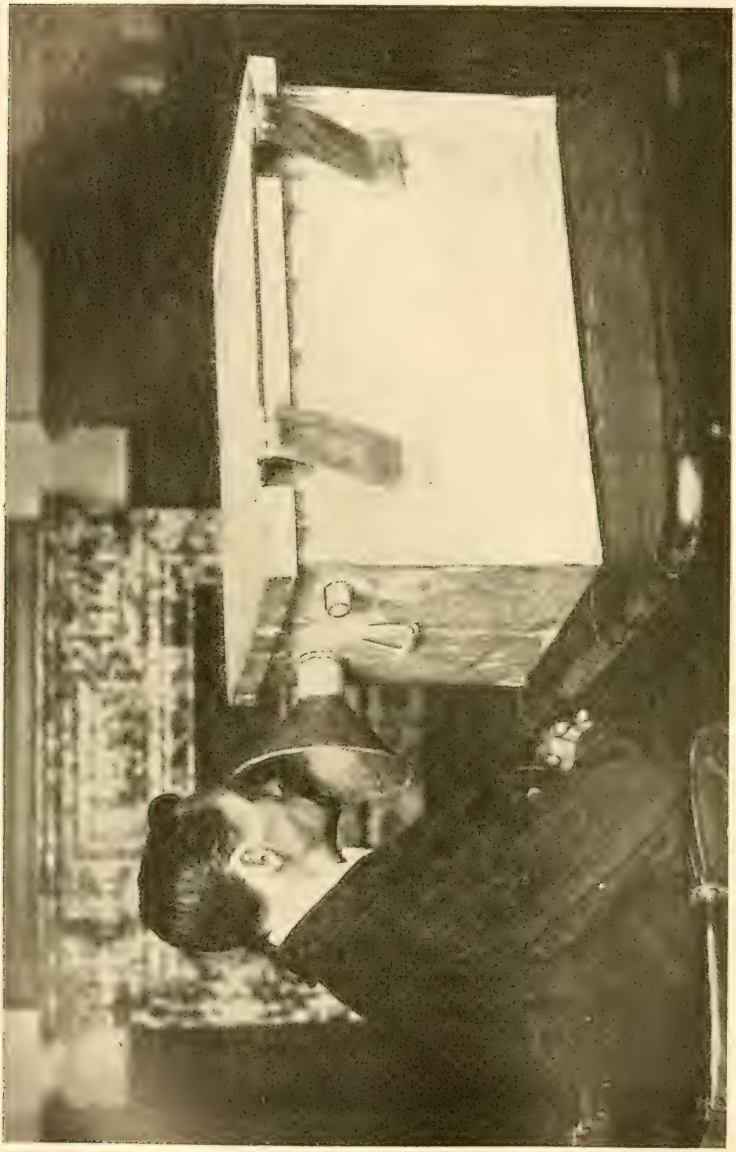


FIG. 4. — Photographie du dispositif employé pour les épreuves d'inhalation directe de l'air expiré au moment de la toux; le malade tousse dans le pavillon et l'air pénètre, en grande partie, dans la caisse contenant des cobayes.

l'inhalation s'enrichit de plus en plus du gaz sortant directement des voies respiratoires du malade.

Une cage contenant des cobayes neufs était placée dans l'appareil. A côté de cette cage étaient deux boîtes de Petri contenant de l'eau stérile : ces récipients devaient, en quelque sorte, servir de témoins et recueillir, s'il en existait, une partie des gouttelettes liquides, même non respirables ; après chaque expérience, le liquide de ces boîtes fut inoculé à 3 ou 4 cobayes pour chacune.

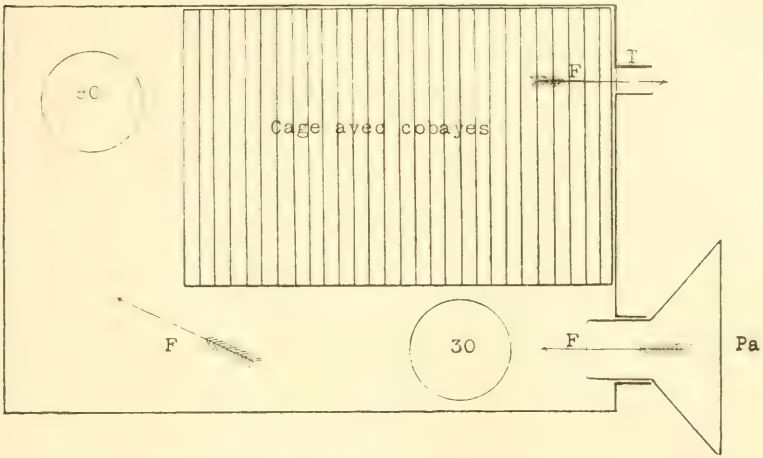


Fig. 5. — Coupe horizontale schématique de la caisse 86 disposée pour l'inhalation de l'air expiré par le tuberculeux ; Pa : pavillon dans lequel tousse le malade ; 30 : boîte de Petri placée à 30 centimètres environ de la bouche du phtisique ; 80 : boîte semblable placée à 80 centimètres environ ; T : tube de décompression ; F : direction du courant aérien.

Exp. I. — Cette expérience est faite avec le malade Bon..., dont les crachats contiennent environ 50.000 bacilles par milligramme. Tout étant préparé comme il est dit ci-dessus, et la caisse contenant 8 cobayes, le malade tousse environ 100 fois dans le pavillon, en une heure ; les cobayes restent à respirer cet air pendant une heure vingt minutes de plus, c'est-à-dire qu'ils sont restés en tout deux heures vingt minutes dans la caisse à inhalation.

Deux de ces animaux périrent trop tôt ; *les six survivants, sacrifiés quarante-deux jours après l'épreuve, n'étaient pas tuberculeux. Ceux inoculés avec les boîtes de Petri sont également restés sains.*

Exp. II. — Exécutée de la même manière avec le malade Bac..., atteint de laryngite tuberculeuse et dont les crachats contenaient environ 100.000 bacilles par milligramme. Ce malade tousse trente fois en une heure. Les cobayes inhalent pendant une heure et demie au total l'air expiré par ce malade.

Un des cobayes meurt vingt-neuf jours plus tard : il est sain. Les sept autres sont sacrifiés quarante-quatre jours après l'expérience ; *aucun d'eux n'est atteint de tuberculose.*

Les cobayes inoculés sous la peau, avec le liquide des boîtes de Petri, sont également indemnes soixante jours après l'inoculation.

Exp. III. — La même épreuve est faite avec le malade Dum..., dont les mucosités sont riches en bacilles (environ 40.000 par milligramme) et qui est également atteint de laryngite bacillaire. Ce malade tousse cinquante fois en une heure, et les cobayes inhalent au total pendant deux heures trente minutes. Deux des animaux périssent trop tôt, d'affection intercurrente commune ; les six survivants meurent ou sont sacrifiés vingt-huit, trente-neuf, et les quatre derniers, quarante-quatre jours après l'expérience ; *tous sont indemnes de tuberculose.*

Les cobayes inoculés avec le liquide des boîtes de Petri, sacrifiés après un délai de deux mois, étaient sains.

Exp. IV. — Réalisée avec le malade Dant..,, également atteint de laryngite bacillaire, et dont les mucosités contenaient environ 100.000 bacilles par milligramme. Ce malade tousse 150 fois en une heure.

Les 8 cobayes inhalent pendant deux heures ; sacrifiés quarante-trois jours plus tard *ils sont indemnes.* Les animaux inoculés sous la peau sont également sains.

Le malade meurt dix-huit jours après la réalisation de cette expérience.

Exp. V. — Cette expérience et les suivantes sont faites dans des conditions plus sévères. Au lieu de faire inhaler aux cobayes l'air expiré par un seul malade, au moment de la toux, nous faisons tousser successivement dans le pavillon de la caisse 86, pendant le séjour des cobayes, plusieurs malades dont les expectorations sont particulièrement riches en bacilles.

Quatre malades participent à la présente expérience ; ce sont :

1° Bon..., environ 50.000 bacilles par milligramme de crachats ; 2° Bill..., environ 60.000 bacilles ; 3° Fav..., environ 25.000 bacilles ; 4° Led..., environ 50.000 bacilles par milligramme.

La caisse à inhalation contient quatorze jeunes cobayes. L'expérience commence à midi vingt-cinq par le malade Bon..., qui tousse 100 fois ; aussitôt après, Bill... tousse 150 fois ; Fav..., tousse 20 fois seulement et Led..., 50 fois. Cela fait en tout 320 efforts de toux dans une caisse de 86 litres et en deux heures. Après la cessation de la toux des quatre malades, les cobayes continuent d'inhaler l'air de la boîte pendant une heure de plus.

Comme à l'ordinaire il y avait en outre dans la caisse deux boîtes de Petri dont le contenu fut inoculé après l'expérience, à 4 cobayes pour chaque récipient.

Un cobaye ayant inhalé périt six jours plus tard ; les 13 survivants furent sacrifiés quarante-cinq jours après l'expérience ; *tous étaient parfaitement sains.* Les sujets inoculés furent d'autre part reconnus indemnes de tuberculose.

Exp. VI. — Cette expérience est faite dans les mêmes conditions que la précédente, mais avec cinq malades au lieu de quatre ;

1° Danel..., 125.000 bacilles par milligramme de crachats ; il tousse 70 fois en quarante minutes ;

2° Bill..., 60.000 bacilles par milligramme ; il tousse 120 fois en trente minutes ;

3° Car..., 50.000 bacilles par milligramme ; il tousse 103 fois en trente-cinq minutes ;

4° Bon..., 80.000 bacilles par milligramme (les crachats de ce malade son plus riches que précédemment) ; il tousse 110 fois en vingt minutes ;

5° Péj..., 60.000 bacilles par milligramme ; tousse 100 fois en trente minutes.

Cela fait en tout 503 efforts de toux. Il y avait dans la caisse 12 cobayes, qui inhalèrent pendant trois heures quinze minutes. Pendant l'expérience la température extérieure était très élevée ; les cobayes, recevant en outre l'air expiré par les malades et saturé d'humidité, furent très incommodés; leur respiration était très accélérée et ils étaient en sueur.

Deux boîtes de Petri contenant de l'eau stérile se trouvaient dans la caisse à inhalation, aux endroits habituels, c'est-à-dire à 30 et 80 centimètres de la bouche des malades. Le liquide de ces boîtes fut inoculé à la fin de l'expérience à 4 cobayes pour chaque boîte ; ces cobayes sont restés sains.

Deux des cobayes à inhalation sont morts après trente neuf jours : *ils n'étaient pas tuberculeux.* Les dix autres ont été sacrifiés le quarante-cinquième jour après l'expérience ; *sur ce nombre neuf étaient indemnes* ; le dernier présentait *un tubercule pulmonaire primitif caséeux bien développé*, avec une adénopathie caséeuse prononcée et des lésions récentes de généralisation, ces dernières visibles dans le poumon (granulations grises), le foie et la rate. Les ganglions hépatiques étaient un peu dégénérés ; ceux du mésentère et de la région cervicale étaient sains. Il s'agissait donc bien d'une tuberculose d'inhalation datant d'environ quarante-cinq jours, c'est-à-dire du moment même de l'expérience.

Exp. VII. — Effectuée dans les mêmes conditions avec trois malades :

1° Bon..., déjà connu; 2° Danel..., également connu; 3° March..., quarante-cinq ans, emphysémateux et cavitaire ; crachats très purulents, épais et émis en grande quantité, d'une teneur de 15.000 bacilles par milligramme.

La caisse étant préparée avec 12 cobayes et des boîtes de Petri, le premier malade tousse 80 fois en quarante minutes ; le second tousse 80 fois également, mais en vingt-cinq minutes ; le troisième tousse 90 fois en cinquante minutes. Au total, la caisse reçoit 250 efforts de toux et les cobayes inhalent pendant trois heures.

Les animaux ayant inhalé ont été sacrifiés après quarante-cinq jours, ainsi que ceux ayant été inoculés ; *aucun ne présentait la moindre trace de tuberculose.*

Exp. VIII. — Cette expérience est effectuée, toujours selon la même méthode, avec deux autres malades : 1° Sor..., trente-cinq ans, tuberculeux cavitaire crachant beaucoup ; mucosités purulentes épaisses contenant 80.000 bacilles par milligramme ; légère laryngite bacillaire. 2° Péj..., déjà connu.

Le malade Sor... tousse 53 fois en trente-cinq minutes ; Péj... le remplace aussitôt et tousse 114 fois en cinquante minutes. Les cobayes continuent d'inhaler l'air suspect pendant quarante minutes. En résumé, deux malades ont toussé 167 fois et les cobayes ont subi l'inhalation pendant deux heures. Comme précédemment, le liquide des boîtes de Petri a été inoculé à 8 cobayes.

Tous ces animaux ont été sacrifiés quarante-quatre jours plus tard : *aucun d'eux n'était tuberculeux à quelque degré que ce fût.*

Dans ces huit dernières expériences, consistant dans l'inha-

lation de l'air expiré au moment de la toux, nous avons opéré au total avec 12 *phtisiques des plus contagieux, lesquels ont toussé* 1570 *fois* dans notre appareil; certains de ces malades se sont prêtés plusieurs fois à l'épreuve. 79 *cobayes ont subi l'inhalation directe de l'air expiré pendant la toux; sur ce nombre d'animaux un seul a contracté un tubercule pulmonaire primitif* dont l'origine ne peut être indiquée avec certitude.

Ce cas d'infection minima est-il dû à une particule liquide? Cela est possible, bien que, dans ces huit expériences, et dans l'expérience VI en particulier, le résultat de l'inoculation du liquide recueilli dans les boîtes de Petri exposées dans la caisse ait toujours été négatif; or 16 boîtes de Petri ont été inoculées à 64 cobayes! Malgré le grand nombre des séances de toux la quantité de particules liquides émises a été nécessairement infime, puisque dans nos récipients il n'a été récolté aucune gouttelette, même grossière, à 30 centimètres de la bouche des malades.

L'infection accidentelle par une particule sèche provenant de l'un de nos sujets nous paraît plus vraisemblable, car plusieurs d'entre eux étaient sales : le malade Bill... avait une très longue barbe; Dan... possédait un mouchoir qui, par agitation, les jours suivants, a communiqué la tuberculose à un haut degré à tous nos cobayes, et cela après plusieurs jours de dessiccation; les cheveux mêmes de ce malade se sont montrés virulents. En présence de certaines difficultés, pour réaliser ces expériences d'inhalation de l'air expiré, nous n'avons pu obtenir les précautions rigoureuses que nous eussions désirées à l'égard des particules sèches pouvant provenir du malade ou de ses vêtements.

Quoi qu'il en soit, si nous considérons ce cas positif comme imputable à une gouttelette bacillifère, nous devons également remarquer que, pour l'obtenir, il a fallu multiplier les épreuves, recueillir une grande quantité d'air dans un récipient et faire inhaler cet air par de nombreux cobayes. Dans la nature le danger serait beaucoup moindre, la dilution immédiate de l'air expiré le réduisant dans des proportions considérables.

Conclusions. — Nous croyons pouvoir conclure de l'ensemble des expériences qui précèdent, qui ont été exécutées par diverses

méthodes et dont les résultats sont concordants, que *la contagion de la tuberculose par les particules liquides directement inhalées ne peut avoir lieu que très rarement et avec la plus grande difficulté*. Le muco-pus bronchique se comporte vraiment comme un produit de défense qui a pour rôle de conglober les produits nocifs et de faciliter leur expulsion en masse ; il en empêche la division et la dispersion dans les parties saines du poumon et du tube digestif, au moins pour la plus grande partie ; il diminue l'étendue des contacts avec les muqueuses ; il rend impossible la pollution de l'atmosphère et s'oppose ainsi, dans une très large mesure, sinon totalement, à la contagion directe par les gouttelettes. La présence de mucine dans la salive buccale, dont la richesse bacillaire est beaucoup moindre, remplit le même rôle de protection.

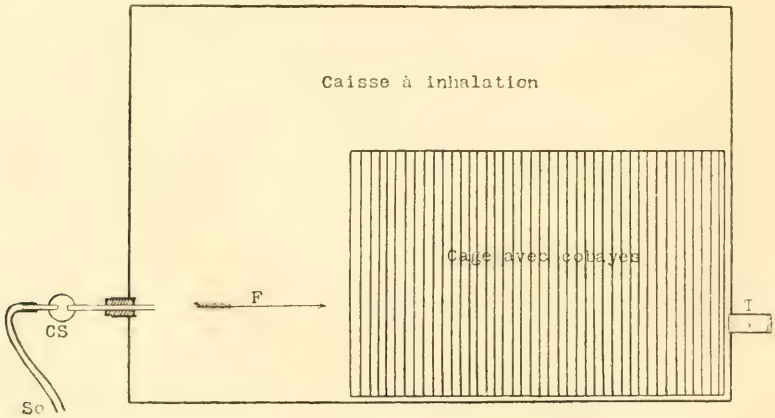
Pour mieux apprécier ces résultats, il est nécessaire de les rapprocher de ceux, constamment positifs, que nous avons obtenus avec les crachats secs, en procédant par brossage ou agitation de linges bacillaires (1), et de ceux, également positifs, qui nous ont été fournis par des expériences de cohabitation de cobayes avec les malades ; ces dernières recherches feront l'objet d'un prochain mémoire.

La plupart des expériences qui précèdent ont été effectuées dans le service de notre excellent maître, M. le professeur Letulle, à l'hôpital Boucicaut ; c'est pour nous un agréable devoir à remplir que de lui exprimer ici notre inaltérable reconnaissance, pour son bienveillant accueil et pour la sollicitude qu'en maintes circonstances il a bien voulu nous témoigner.

(1) P. Chaussé, Transmissibilité de la tuberculose par brossage de vêtements souillés. *Bull. de l'Acad. de Médecine*, 13 mai 1913, et *Revue d'Hygiène et de police sanitaire*, du 20 mai 1913.

P. Chaussé, Transmissibilité de la tuberculose par agitation de linges bacillaires. *Bull. de l'Acad. de Médecine*, 22 juillet 1913, et *Revue d'Hygiène et de police sanitaire*, du 20 octobre 1913.

Erratum. — La figure qui porte le nº 3 dans le premier mémoire de M. Chaussé (ces *Annales*, juin 1914, p. 615), doit être remplacée par la figure ci-dessous, la légende étant conservée.



L'INFLUENCE DE LA RÉACTION DU MILIEU SUR L'ACTION DE L'INULASE DE L'ASPERGILLUS NIGER

par A. KIESEL

(Travail du laboratoire de M. le professeur Gabriel Bertrand.)

L'inulase, découverte par Green (1) dans les tubercules en germination du topinambour, fut retrouvée par Bourquelot (2) dans le mycélium de l'*Aspergillus niger*. Mais, déjà avant la découverte de Green, Bourquelot (3) avait observé le développement de cette moisissure sur un milieu contenant de l'inuline, fait qui rendait très probable l'existence de l'inulase dans l'*Aspergillus niger*.

L'inulase a été étudiée ensuite dans la même moisissure, par Dean (4), Richaud (5) et dans les derniers temps par Boselli (6).

Pour l'inulase du topinambour, Green a indiqué que l'action optimale sur l'inuline avait lieu à 40 degrés en solution neutre, en ajoutant toutefois que la présence de traces d'acide ne gênait pas, mais favorisait plutôt la réaction. L'acidité du suc du topinambour correspondait dans ses expériences à 0,001 p. 100 ou à 1/3640-norm. HCl, et c'est cette concentration qu'il a appelée optimale dans son livre sur les diastases (7).

La réaction alcaline fut trouvée très nuisible par Green.

L'inulase de l'*Aspergillus niger* se comporte en général de la même façon envers les acides et les alcalis, quoique les auteurs qui se sont occupés de cette question donnent des chiffres très différents pour les concentrations optimales et paralysantes des acides.

(1) *Annals of Botany*, vol. I, 1888, p. 223.
(2) *Journ. de pharm. et de chim.*, 5e série, t. XXVIII, 1893, p. 5; *Comptes rendus de l'Acad. des sciences*, t. CXVI, 1893, p. 1143.
(3) *Journal de l'Anatomie et de la Physiologie*, 1886, p. 193.
(4) *Bot. Gaz.*, t. XXXV, 1903, p. 24.
(5) *Thèse* (1900), Recherches physiologiques sur l'inulase et sur l'inuline.
(6) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXV, 1911, p. 695.
(7) *Die Enzyme*, p. 85 (Trad. de Windisch, 1901).

Ainsi Dean (1) indique une très petite concentration optimale : 0,0001-norm. pour l'acide sulfurique à + 35-37 degrés. Déjà 0,0002-norm. est moins favorable, 0,001-norm. diminue et 0,01-norm. arrête l'action de la diastase. Boselli (2) trouve, pour la même température (35 degrés), une concentration optimale beaucoup plus forte : en ajoutant toujours une solution diastasique neutralisée à l'hélianthine, il trouve la concentration optimale pour l'acide sulfurique à 0,009-norm. et pour l'acide acétique à 0,16-norm. L'action de l'inulase ne se produisait plus en présence des concentrations dépassant 0,06-norm. pour l'acide sulfurique et 0,60-norm. pour l'acide acétique.

Quant à l'action des alcalis, nous ne trouvons des indications précises que chez Dean : la potasse caustique à 0,0001-norm. affaiblit déjà, à 0,001-norm. diminue fortement et à 0,01-norm. arrête complètement l'action diastasique. D'après Boselli, la concentration de la soude caustique à 0,002-norm. suffit pour arrêter le dédoublement de l'inuline par l'inulase de l'*Aspergillus niger*.

Dans le présent travail, j'ai eu l'intention de vérifier les résultats des auteurs que j'ai cités en tenant compte du changement de la réaction du milieu par l'addition de la diastase (3) et d'étudier en même temps l'action comparée de divers acides dans le dédoublement diastasique de l'inuline en présence d'inulase, comme cela a déjà été fait pour quelques autres diastases : la laccase, la peroxydiastase, la sucrase et la maltase (4).

En prenant comme critérium de l'activité des acides les concentrations optimales, — les plus caractéristiques pour le processus diastasique — j'ai constaté l'absence d'un optimum assez

(1) *Loc. cit.*

(2) *Loc. cit.*

(3) G. Bertrand et M. et Mme Rosenblatt, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXVI, 1912, p. 3212.

(4) G. Bertrand, *Bulletin de la société chimique*, 4e série, t. I, 1907, p. 1120; G. Bertrand et Mlle Rozenband, *ibid.*, t. V, 1909, p. 296; Fernbach, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. III, 1889, p. 531; Görensen, *Trav. du lab. de Carlsberg*, t. VIII, 1909, p. 1; Euler et Beth af Ugglas, *Zeit. f. phys. Chem.*, t. LXV, 1910, p. 124; Hudson et Paine, *Journ. Amer. Chem. Soc.*, t. XXXII, 1910, p. 774; Michaelis et Davidson, *Bioch. Zeit.*, t. XXXV, 1911, p. 386; G. Bertrand et M. et Mme Rosenblatt, *Bulletin de la société chimique*, 4e série, t. XI, 1912, p. 176 et 464 Kopaczewski, *Thèse*, Fribourg, 1911; *Zeit. f. physiolog. Chem.*, t. LXXX, 1912, p. 182.

bien défini pour qu'on puisse faire le calcul d'activité avec quelque précision. Il est évident que je ne pouvais pas obtenir une série de chiffres comparable à celle qu'ont obtenue G. Bertrand et M. et Mme Rosenblatt (1). C'est pour cela que je me suis contenté d'étudier seulement un petit nombre d'acides.

Les acides étudiés étaient les acides sulfurique, chlorhydrique, phosphorique et acétique.

Outre l'influence des acides nommés, j'ai encore étudié celle du carbonate de sodium, de certains sels acides, ces derniers étant choisis d'une acidité croissante comme l'indique le tableau suivant :

	A L'HÉLIANTINE	A LA PHTALÉINE
Carbonate de soude....	Alcalin.	Alcalin.
Phosphate bisodique	Alcalin.	Neutre.
Citrate bisodique	Neutre (2).	Acide (2).
Phosphate monosodique ..	Neutre.	Acide.
Citrate monosodique	Acide (2).	Acide.

L'inuline qui a servi pour les expériences provenait des tubercules de Dahlia et m'était généreusement fournie par M. G. Bertrand.

La diastase était employée sous forme d'extrait de mycélium d'*Aspergillus niger*, cultivé à 35 degrés sur le liquide de Raulin, pendant soixante-dix-sept heures. Après un rapide lavage avec de l'eau distillée, le mycélium était desséché dans le vide à 28 degrés et pulvérisé. Pour chaque série d'expériences on utilisait une macération fraîche. On broyait 0,25 gramme de la poudre avec un peu d'eau, on amenait le volume à 25 cent. cubes et on laissait macérer pendant vingt-quatre heures à 35 degrés. Après avoir filtré, on diluait le liquide diastasique complètement limpide avec trois volumes d'eau. Pour chaque expérience, on prenait 2 cent. cubes de ce liquide dilué.

Dans ces 2 cent. cubes on trouva :

Résidu sec après l'évaporation de l'eau.....		2 milligr.
Alcalinité à l'hélianthine	1,25 cent. cube.	0,001-norm.
Acidité à la phtaléine du phénol.	2 » cent. cubes.	0,001-norm.

En calculant l'alcalinité et l'acidité de la solution diastasique pour 6 cent. cubes du liquide total de chaque expérience nous

(1) *Loc. cit.*.
(2) G. Bertrand, *Bulletin de la Société chimique*, 4e série, t. I, 1907, p. 1128.

trouvons un changement de la réaction dû à la diastase introduite égal à :

Alcalinité à l'héliantine	1/4800-norm.
Acidité à la phtaléine du phénol.	1/3000-norm.

Dans chaque expérience, faite dans de petits tubes à essai en verre d'Iéna, on pesait dans le tube 100 milligrammes d'inuline. On les dissolvait dans 1 à 4 cent. cubes d'eau en plongeant le tube dans l'eau bouillante un temps juste suffisant pour la dissolution. Après le refroidissement rapide du tube, on ajoutait la dose correspondante d'un acide titré et convenablement dilué pour avoir en tout 4 cent. cubes. Ensuite, on ajoutait 2 cent. cubes de la solution diastasique et V gouttes de toluène. Après avoir bien mélangé le contenu des tubes, on abandonnait ceux-ci, pendant vingt heures, plongés dans l'eau, dans une chambre thermostat à + 35 degrés.

On trouvait ainsi, à la fin des expériences, dans les tubes sans acide, un dédoublement de l'inuline correspondant à peu près à 20 milligrammes du sucre réducteur; alors il y avait toujours un grand excès d'inuline inattaquée.

Dans chaque série d'expériences, il y avait toujours deux témoins sans acide que l'on analysait l'un au commencement, l'autre à la fin de la série.

Pour arrêter les expériences, on ajoutait III gouttes de soude normale après avoir neutralisé l'acide ajouté, en refroidissant le tube. Cette quantité fut trouvée suffisante pour arrêter complètement l'action diastasiqne sans détruire le lévulose formé.

Les doasges du sucre réducteur ont été faits suivant la méthode de G. Bertrand (1).

Chaque expérience avec les acides comportait un témoin préparé dans les mêmes conditions, avec la seule différence que la diastase était préalablement inactivée par chauffage au bain-marie.

Ces témoins ont démontré que l'inuline est fortement hydrolysable même par les concentrations très faibles des acides.

(1) *Bulletin de la Société chimique*, 3e série, t. XXXV, 1906, p. 1285.

ACTION DES ACIDES

Tous les acides étudiés produisaient une action favorisante sur le dédoublement diastasique de l'inuline, même si on les ajoutait en quantités si petites qu'elles ne suffisaient pas pour la neutralisation de l'alcalinité de la diastase à l'héliantine (1/4800-norm.).

Ainsi, j'ai trouvé une augmentation suivante de l'activité de la diastase :

Avec 1/12000 mol.-gr.	d'acide sulfurique	14	p. 100
Avec 1/6000 —	d'acide chlorhydrique	15	—
Avec 1/12000 —	d'acide phosphorique	15	—
Avec 1/6000 —	d'acide acétique	14	—

Ces chiffres nous prouvent que l'activation était à peu près la même dans le cas de tous les acides étudiés. Mais on remarquait encore une activation produite par les acides en concentrations plus petites.

En augmentant les concentrations en dehors de la neutralité à l'héliantine, on observa une différence très nette entre l'acide acétique et les acides minéraux. Pour l'acide acétique, l'activation atteinte par la neutralisation à l'héliantine de la solution diastasique ajoutée changea très peu jusqu'à la concentration où on commença à trouver une diminution d'activité de la diastase, c'est-à-dire jusqu'à environ 1/5 mol.-gr. Pour les autres acides, l'activation par les concentrations, dépassant la neutralité à l'héliantine, augmentait assez régulièrement et atteignait un chiffre maximum qui était situé dans une zone plus ou moins large des concentrations croissantes.

L'optimum, ou l'activation maxima, était situé dans les limites suivantes :

Avec l'acide sulfurique	Entre 1/343 et 1/240 mol.-gr.
Avec l'acide chlorhydrique	Entre 1/120 et 1/100 mol.-gr.
Avec l'acide phosphorique	Entre 1/90 et 1/72 mol.-gr.
Avec l'acide acétique	Entre 1/2000 et 1/50 mol.-gr.

Pour l'acide acétique, il y avait après cette zone un affaiblissement d'activation, mais cet affaiblissement était tellement lent que les limites de la zone optimale ne pouvaient pas être

précisées. Peut-être aurait-il fallu étendre cette zone dans la direction des concentrations plus grandes.

Dans la série des concentrations croissantes, il ne manquait pas d'irrégularités (1) dans les résultats trouvés de l'action diastasique ; seulement, ces irrégularités, chose inexplicable, étaient les plus grandes en présence des petites concentrations de tous les acides et en présence de l'acide acétique de toutes concentrations, c'est-à-dire dans tous les cas de faible activation du phénomène diastasique.

En prenant les moyennes dans les zones optimales des acides, nous avons :

	CONCENTRATION optimale (moyenne).	ACTIVITÉ COMPARÉE DES ACIDES (HCl = 100) EN PRÉSENCE DE			ACTIVITÉ dans l'inversion du saccharose (2).
		l'inulase de l'*Asp. Nig.*	sucrase de levure (1).	sucrase de l'*Asp. Nig.* (1).	
Ac. sulfurique	m/291	265	128,5	95,25	107,2
Ac. chlorhydrique . .	m/110	100	100 »	100 »	100 »
Ac. phosphorique . .	m/81	74	19,6	39,5	18,63
Ac. acétique	?	(?)	10,7	2,38	0,40

(1) G. Bertrand et M. et Mme Rosenblatt, *loc. cit.*
(2) W. Ostwald. *Jahresb. üb. Fortsch. d. Chem.*, 1884, p. 21.

On voit bien qu'il n'y a pas de correspondance étroite entre l'activité des acides dans le dédoublement diastasique de l'inuline et celle dans les autres phénomènes, quoique les acides se suivent dans le même ordre dans tous les cas.

Les résultats trouvés sont ainsi en général d'accord avec les résultats de G. Bertrand et M. et Mme Rosenblatt (2). C'est-à-dire qu'*à côté de l'action des ions des acides, nous avons trouvé une action indubitable des anions dans le phénomène diastasique.*

La plus grande activation était obtenue avec les acides chlor-

(1) Irrégularités dues aux petites erreurs inévitables dans le mesurage des solutions constituantes.
(2) *Loc. cit.*

hydrique et phosphorique ; l'acide sulfurique a montré une activation moins grande.

Activation maximale :

Avec l'acide sulfurique	54 p. 100
Avec l'acide chlorhydrique	78 —
Avec l'acide phosphorique	77 —
Avec l'acide acétique	20 —

Comme concentrations maximales arrêtant le dédoublement diastasique de l'inuline, on trouva :

		ACTIVITÉ HCl = 100
Avec l'acide sulfurique	> 1/48 mol.-gr.	190
Avec l'acide chlorhydrique	> 1/25 mol.-gr.	100
Avec l'acide phosphorique	> 1/3 mol.-gr.	12
Avec l'acide acétique	> 3 mol.-gr.	1,3

L'activité des acides calculée pour les concentrations maximales présente une différence assez grande avec l'activité en concentrations optimales.

ACTION DES SELS ALCALINS

Le carbonate de sodium et le phosphate bisodique, si on prend leur alcalinité correspondant à l'héliantine, c'est-à-dire l'alcalinité moléculaire du phosphate égale à la moitié de l'alcalinité moléculaire du carbonate de sodium, se montrent dans les concentrations initiales à peu près d'un même effet nuisible.

En comparant de cette façon les résultats obtenus avec les différentes concentrations de ces sels nous avons trouvé :

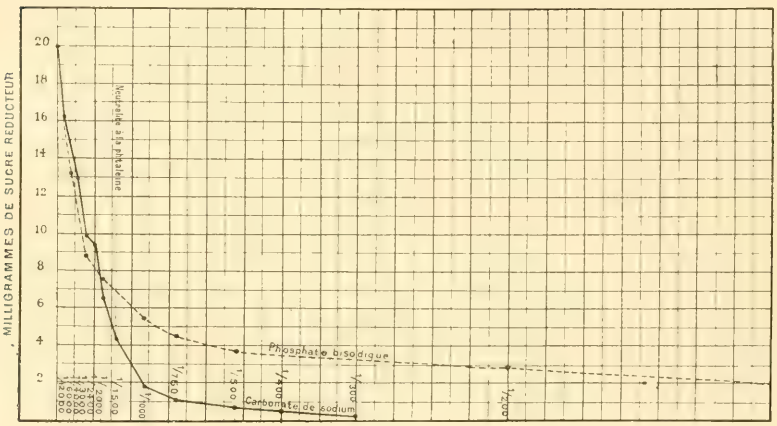
	1/12000	1/6000	1/3000	1/2000	1/1000	1/750	1/500-norm.
Carbonate de sodium.	16,2	14,2	9,9	6,6	1,8	1,1	0,7 mgr.
Phosphate bisodique.	16,2	13,3	8,9	7,5	5,3	4,5	3,7 mgr.

Dans ce tableau, on a marqué les quantités de sucre réducteur formé en m.-gr. ; au-dessus de ces chiffres on a mis les concentrations correspondantes des sels par rapport à l'héliantine. Nous voyons qu'au commencement, jusqu'à la concentration 1/3.000-norm., le carbonate de sodium est même un peu moins défavorable que le phosphate ; après cette concentration, l'ordre est renversé, mais ce n'est qu'à partir de la concentration 1/2.000-norm. (1/4.000-mol. pour le carbonat de

sodium) que l'action pernicieuse du carbonate augmente rapidement, tandis que l'action du phosphate monte peu à peu et n'arrête même pas complètement le dédoublement diastasique de l'inuline à une concentration de 1/100-norm.

On comprend bien cette différence brusque dans l'action du carbonate de sodium après 1/4.000-mol., si on se souvient que la concentration de 1/3.000-mol. de carbonate de sodium (1) correspond à la neutralisation à la phtaléine de la solution diastasique ajoutée. Le phosphate bisodique, neutre à la phtaléine du phénol, ne peut pas dépasser ce point de réaction du milieu Le carbonate le dépasse.

TABLEAU I



Concentrations en norm. à l'héliantine.

FIG. 1.

Les courbes de la figure I nous donnent l'illustration de ces faits et des expériences faites avec les deux sels nommés. L'influence pernicieuse des alcalis est mesurable non seulement par rapport à l'héliantine, mais aussi par rapport à la phtaléine du phénol.

ACTION DES SELS ACIDES

Les sels étudiés présentaient certains inconvénients. Employés à de grandes concentrations, ils commençaient à préci-

(1) Ou 1/3.000-norm. à la phtaléine du phénol.

piter l'inuline. Cette précipitation devait sûrement être suivie d'une diminution du dédoublement qui ne correspondait pas à l'action du sel sur le travail de la diastase.

D'autre part, dans les concentrations encore plus grandes, où l'action était encore favorable, les sels commençaient à se dissoudre très lentement dans les conditions données : on était obligé d'ajouter les sels dans ces cas à l'état solide à cause de l'impossibilité d'avoir des solutions bien mesurables (1) ou en solutions assez concentrées, avant l'introduction du liquide diastasique. Après l'introduction de la solution diastasique, on ne pouvait plus chauffer les tubes pour faciliter la dissolution et on comprend bien qu'il devait y avoir dans ces conditions des grandes irrégularités, même dans les expériences identiques. Les résultats obtenus pour les grandes concentrations ne présentent qu'une précision très petite.

L'action du citrate monosodique est très différente de l'action de deux autres sels. Elle ressemble surtout à l'action de l'acide acétique : le citrate monosodique active déjà l'inulase à de petites concentrations (pour 1/1.200 mol.-gr. l'activation est de 16 p. 100) ; il ne change presque plus du tout cette activation jusqu'à 1/20 mol.-gr. ; enfin, l'activation devient de plus en plus petite et, pour 1/4,8 mol.-gr. du sel, l'action diastasique revient au niveau de l'action en l'absence du sel. Le maximum de l'activation trouvé dans toutes les expériences (19 p. 100) est à peu près le même que pour l'acide acétique. Nulle concentration n'arrêtait le travail de la diastase.

Le citrate bisodique et le phosphate monosodique agissaient en général de la même façon. Seulement, le phosphate commençait à produire son action sous des concentrations plus petites : pour le phosphate, on trouva une activation nette à 1/100 mol.-gr., pour le citrate seulement à 1/10 mol.-gr. Néanmoins, l'action du citrate augmentait plus vite et dans sa concentration optimale, près de 1,5 mol.-gr., le citrate produisait une activation plus forte. A vrai dire, on remarqua déjà à cette concentration une précipitation partielle de l'inuline et aussi une solution incomplète des sels. Les grandes irrégularités dépendant de ces deux faits dans les expériences parallèles ne

(1) A cause de la grande viscosité.

nous permettent pas de tirer des conclusions irréprochables. S'il n'y avait pas intervention de ces faits secondaires, l'opti-

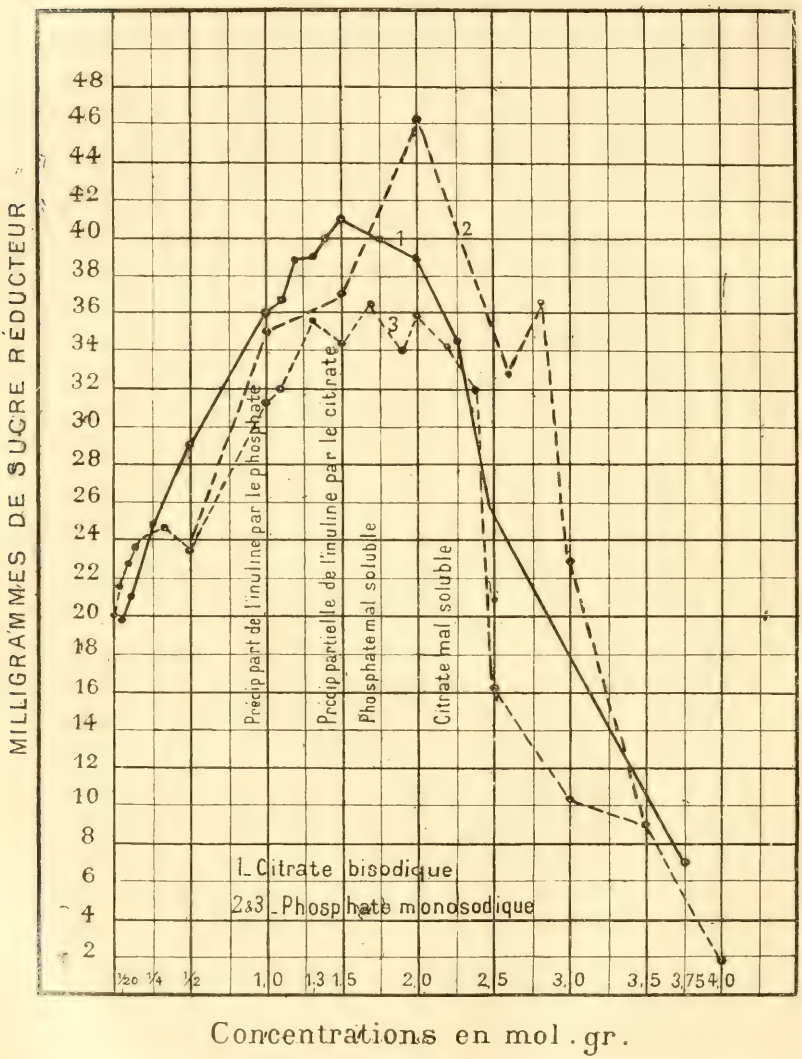


Fig. 2.

mum devrait être trouvé probablement en présence des concentrations plus fortes des sels et le dédoublement de l'inuline aurait été trouvé plus grand. Je dois ajouter que les deux

inconvénients dans les expériences étaient plus marqués en présence du phosphaste.

Pour ces raisons je me suis contenté de donner ici les résultats trouvés sous forme de courbes dans la figure II. Les courbes 2 et 3 représentent les résultats maxima et minima obtenus pour le phosphate dans deux séries d'expériences.

On pouvait s'attendre à ce que l'inulase, étant favorisée par les acides, surtout par les acides minéraux, serait plus favorisée par le sel acide plus dissocié et donnant plus d'ions H, c'est-à-dire plus favorisée par le citrate monosodique que par le citrate bisodique (1). En réalité, c'est l'inverse qu'on a trouvé, le citrate bisodique produisait une action plus forte, quoique, en rapport avec la dissociation plus petite, sa concentration optimale était trouvée plus forte que pour le citrate monosodique.

Les plus grandes activations trouvées étaient :

Avec le citrate monosodique.	19 p. 100
Avec le citrate bisodique.	104 —
Avec le phosphate monosodique.	131 —

Cette action plus forte produite par le citrate bisodique reste inexplicable.

(1) D'après Kahlenberg et Austin (*Journ. of physic. chem.*, t. IV, 1899, 553), 1 gramme d'ions H, dosés d'après l'inversion du saccharose par les solutions de 1/128 mol.-gr., est contenu dans 6,666 litres de solution de citrate monosodique et 21,333 litres de citrate bisodique.

Le Gérant : G. Masson.

Paris - L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

28e ANNÉE AOUT 1914 N° 8
(Paru le 25 Novembre 1914.)

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ESSAIS SUR LA PATHOGÉNIE DU CHOLÉRA

par H. VIOLLE.

La pathogénie du choléra est peut-être le point le plus obscur de cette maladie. Nous ne parlons pas, bien entendu, de la pathogénie des symptômes cholériques, mais du mode de développement du vibrion de Koch chez l'homme : pathogénie du vibrion plutôt que pathogénie du choléra.

Nous avons en vue le vibrion donnant le choléra typique, l'attaque qui apparaît brusquement et terrasse le sujet en pleine vigueur. Or, ce qui est si rapide, ce n'est pas seulement le développement des grands symptômes externes, mais aussi le développement du vibrion dans l'organisme, dont le premier n'est que le reflet bruyant. A côté du drame externe, si violent dans son évolution, que nous n'en voyons souvent que le dernier acte, se joue un drame interne, encore plus rapide et qui est le créateur de l'action.

Or, pour surprendre à ses différentes phases le développement du vibrion cholérique dans l'intestin, il est nécessaire de reproduire expérimentalement l'affection, et de se rendre maître de tous les facteurs. L'autopsie dans les cas typiques ne nous révèle que le fait un peu déconcertant de la présence d'une purée blanchâtre, sorte d'eau de riz, occupant tout le conduit intestinal, et de parois congestionnées, lie de vin ou rouge hortensia. L'expérimentation encore que positive ne nous donne pas la clef du problème ; les résultats heureux obtenus par diffé-

rents auteurs chez les animaux prouvèrent seulement que ces animaux n'étaient pas totalement réfractaires au choléra et rien de plus.

En 1894, M. Metchnikoff, s'étant attaqué à ce problème, obtint des résultats extrêmement intéressants. Il se basa sur ce fait, qui devait le conduire plus tard à sa théorie si féconde des fermentations intestinales provoquées par les microbes, que le vibrion cholérique amené du milieu extérieur dans le tube digestif devait forcément, en face d'une flore très nombreuse, compter avec ses divers représentants. Il s'en suivait que pour simplifier le problème, il fallait éliminer cette flore inconnue, agir sur des intestins aussi peu septiques que possible : les conditions se trouvaient réalisées chez les animaux encore à la mamelle, par conséquent nourris seulement de lait et dont l'intestin ne renfermait qu'un nombre restreint de bactéries. Les expériences faites sur des lapins nouveau-nés furent positives; elles démontrèrent que le vibrion cholérique était bien l'agent du choléra ; elles ne démontrèrent point comment le choléra se développe chez l'homme adulte. Allant alors plus loin, M. Metchnikoff établit *in vitro* que certaines bactéries banales telles que les torula, les sarcines, quelques bacilles coliformes facilitaient le développement du vibrion, et que d'autres microbes, inversement, enrayaient cette prolifération. Passant des tubes de culture à l'animal, il arriva en associant avec le vibrion cholérique des espèces favorisantes à provoquer un choléra typique chez les jeunes lapins à la mamelle.

Cette théorie de microbes favorisants et empêchants, où le vibrion cholérique joue sans doute le rôle principal, mais n'est pas tout dans l'étiologie du choléra, est basée sur des faits théoriques et pratiques indiscutables. Toutefois, elle explique malaisément le développement de ces épidémies foudroyantes de choléra où il est impossible, tout en admettant une virulence spéciale et temporaire de l'agent, de saisir le rôle exclusif de la flore intestinale chez chaque individu qui succombe à l'attaque.

C'est en présence de faits d'expérimentation, que nous nous sommes trouvés conduits à envisager l'hypothèse que d'autres facteurs, et principalement les sécrétions des glandes diges-

tives peuvent intervenir dans la pathogénie de la maladie cholérique.

Injectons dans les veines d'un lapin adulte (2 à 3 kilogrammes) une dose mortelle de bouillon de culture cholérique : à l'autopsie nous retrouvons le vibrion, non seulement dans le sang où il fut injecté, mais encore dans l'intestin grêle où il est passé. Or, si l'on ouvre sur toute sa longueur cet intestin grêle aussitôt après la mort et, si après l'avoir lavé rapidement, on l'examine avec soin, on verra que la muqueuse est congestionnée, et que la congestion est un peu plus prononcée à 20 ou 30 centimètres à partir du pylore, restant telle jusqu'au cæcum. Autrement dit, la première portion de l'intestin grêle est moins atteinte que les suivantes. Or, que voyons-nous à la limite des deux zones : un point en saillie, la caroncule du canal pancréatique; tout l'intestin en aval, y compris cette caroncule et une zone aréolaire, est rouge ; en amont il est légèrement rosâtre.

Prélevons un peu de l'enduit déposé à la surface de la muqueuse, en amont et en aval du canal pancréatique, et examinons-le au microscope : nous trouvons dans les deux portions des vibrions, mais le frottis d'amont en contient extrêmement peu, et le frottis d'aval beaucoup.

Partant de ce fait, nous allons essayer de déterminer le rôle joué par les sucs digestifs dans le choléra. Aliments, microbes et sucs digestifs sont les trois substances qui forment le contenu du tube digestif. Cherchons l'effet des diastases intestinales sur le vibrion cholérique.

Pancréas. — Et d'abord le suc pancréatique. Nos expériences portèrent sur le lapin qui présente dans la série animale ce fait particulier, d'avoir le canal de Wirsung débouchant 20 à 30 centimètres plus bas que le canal cholédoque (fig. 1). Les deux sécrétions sont donc absolument séparées l'une de l'autre, et c'est en utilisant cette séparation, rappelons-le, que Claude Bernard établit ses découvertes sur la digestion pancréatique des graisses. La sécrétion pancréatique chez le lapin est continue et abondante.

Supprimons l'action du pancréas. La ligature du canal de Wirsung serait insuffisante car, quoiqu'il n'y ait pas d'autres canaux excréteurs, le suc pancréatique peut être résorbé dans

la circulation générale et modifier le résultat des expériences. La destruction de la glande sera donc faite soit par le fer rouge, soit par l'injection de suif fondu dans ses canaux. En supprimant la glande par un de ces procédés et en injectant le vibrion dans l'intestin et en aval (*6*, fig. 1), on n'arrive point à déterminer le choléra chez l'animal.

Même résultat négatif si l'on a injecté le vibrion en amont, c'est-à-dire entre le canal cholédoque et le canal de Wirsung (*5*, fig. 1).

Même résultat négatif si l'injection est faite au niveau même de l'orifice de sortie du canal pancréatique.

Maintenons l'action du pancréas. Faisons les inoculations de vibrions dans l'intestin aux trois points précédents : au lieu même de sortie du suc pancréatique, en aval et en amont : dans les trois cas résultats négatifs.

Exaltons l'action du pancréas. Pour ce faire, injectons dans les veines de l'animal et d'une façon subintrante de la sécrétine, et inoculons-lui du vibrion dans l'intestin au niveau du canal de Wirsung : résultat encore négatif.

Foie. — Portons-nous maintenant vers le foie ; la sécrétion biliaire chez le lapin est continue et très abondante, atteignant plus de 250 grammes en 24 heures (lapin moyen) : une fistule du cholédoque laisse s'écouler la bile goutte à goutte ; d'autre part, on sait que la vésicule biliaire vidée de tout son contenu est à nouveau remplie en quelques minutes (1). La mort par rétention biliaire est très variable : le canal cholédoque étant lié seul ou avec son paquet vasculo-nerveux et au niveau de son point d'abouchement dans le duodénum (1 à 2 centimètres au-dessous du pylore), la survie est de 2 à 12 jours, chiffres extrêmes, généralement 5 à 6 jours. L'animal meurt avec tous les signes d'ictère grave (reins de couleur iodoforme, teinte ictérique de toutes les muqueuses, amaigrissement considérable, etc.). La teinte subictérique des conjonctives apparaît dès le lendemain de l'opération.

Injections chez les lapins dont le cholédoque est lié (y compris

(1) H. Violle, De la vésicule biliaire comme lieu d'inoculation. *Thèse de Doctorat ès sciences*. 1912.

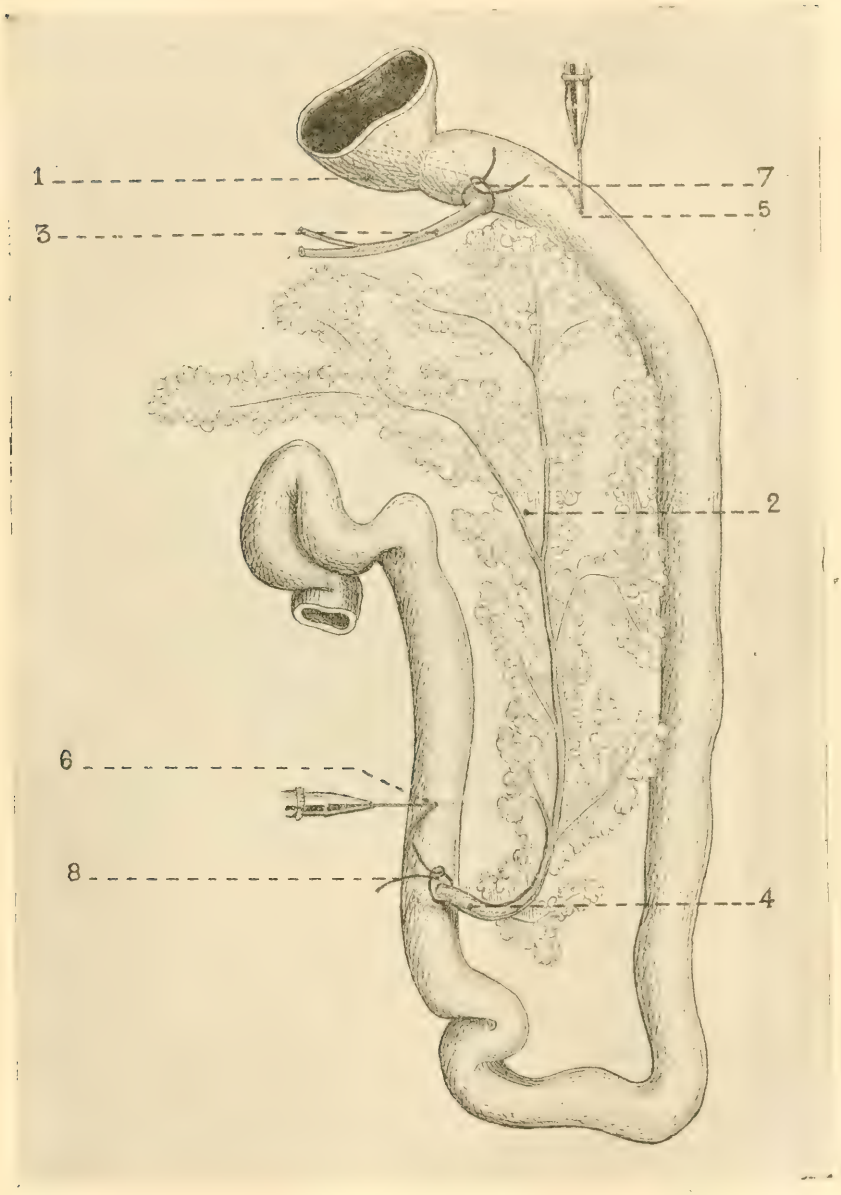


Fig. 1. — Intestin grêle de lapin (portion initiale).

1, Pylore. 2, Pancréas. 3, Canal cholédoque. 4, Canal pancréatique. 5, Injection intestinale haute ou sus-pancréatique. 6, Injection intestinale basse ou sous-pancréatique. 7, Ligature du canal cholédoque, 8, Ligature du canal pancréatique.

ou non les vaisseaux) du vibrion cholérique dans l'intestin à quelques centimètres au-dessous du pylore : l'animal n'éprouve aucun trouble.

Répétons la même expérience mais en faisant l'injection de vibrions plus bas, à 1 ou 2 centimètres au-dessous du canal de Wirsung : l'animal meurt rapidement d'une attaque typique de choléra. Sur neuf cas, huit positifs. L'animal opéré l'après-midi est trouvé mort et froid le lendemain matin, ayant succombé dans certains cas en l'espace de quelques heures.

A l'autopsie, l'intestin grêle se montre plus ou moins congestionné, allant d'une coloration rosée à une coloration lie de vin ou rouge écarlate ; cette teinte intéresse toute la longueur de l'intestin grêle, y compris le cæcum, qui présente généralement un fin piqueté hémorragique ; elle est souvent un peu plus prononcée dans le voisinage du pylore et de l'orifice de sortie du canal de Wirsung. A l'intérieur de l'intestin, on trouve sur tout le trajet un liquide très abondant, blanc ou blanc jaune sale, légèrement visqueux et ressemblant à de l'eau albumineuse ou de l'eau de riz, ne présentant pas d'odeur ou une odeur légèrement fade. Examinée à l'état frais, une goutte de ce liquide fourmille de vibrions ; par place on ne voit que des formes vibrionniennes. Ensemencée dans un ballon d'eau peptonée ou de bouillon de panse de porc, une goutte du contenu intestinal donne, après quelques heures, une culture pure de vibrions ayant tous les caractères du vibrion d'inoculation. Examiné sur les frottis faits avec une parcelle de mucus, le vibrion montre des aspects différents : tantôt la forme en virgule typique, tantôt des formes allongées, tantôt, et c'est l'aspect le plus souvent rencontré dans l'intestin grêle, des formes spiralées de deux, trois, quatre et cinq éléments vibrioniens avec prédominance des formes à deux spirales (V. fig. 2). Les grains riziformes contiennent, outre les vibrions caractéristiques, des cellules endothéliales de desquamation, des leucocytes et du mucus qui agglomère les divers vibrions.

Il résulte de ces faits que le vibrion injecté a déterminé l'attaque de choléra et par suite, que non seulement il n'a pas été détruit dans l'intestin, non seulement il a conservé sa vitalité, mais il s'est trouvé dans des circonstances telles qu'il s'est développé avec une rapidité extrême, provoquant en l'espace

de quelques heures une entérite très prononcée. Le vibrion a remonté l'intestin grêle, pullulant en un temps très court mieux qu'en n'importe quel autre milieu artificiel, ne tenant compte dans ce développement que rien ne paraît pouvoir entraver, ni de l'alimentation de l'animal, ni de l'état de son intestin, ni du régime, ni de la température. Ici nous avons seulement modifié

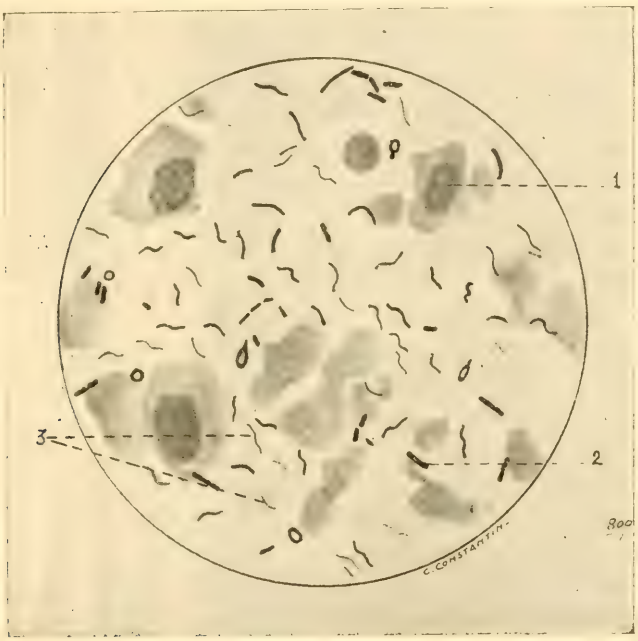


Fig. 2. — Frottis de contenu intestinal de lapin mort de choléra.
1, Cellules endothéliales. 2, Bactéries diverses. 3, Vibrions cholériques.

un facteur par la suspension de la sécrétion biliaire, et nous avons choisi le lieu d'inoculation après le canal de Wirsung.

La quantité de vibrions injectés dans ces expériences est faible : nous avons généralement employé 1 cent. cube (bouillon de vibrions cholériques de 18 heures à 37 degrés) (1) par kilogramme d'animal. Nous avons employé aussi 3 cent. cubes, 2 cent. cubes, 1/2 cent. cube, 1/4 de cent. cube par kilogramme.

(1) Vibrion cholérique de l'épidémie de Marseille, 1911.

et nous avons obtenu dans tous ces différents cas des résultats positifs. Le jour suivant l'inoculation, le vibrion avait transformé tout le contenu intestinal représentant plus de 20 cent. cubes en une bouillie blanchâtre remplie des produits de sa pullulation.

L'examen des autres organes ne présente point grand intérêt. La vessie est vide, la cavité péritonéale renferme généralement un peu de liquide, résultat de la réaction opératoire; le cœur et les poumons sont normaux ; les reins et la rate ne présentent aucune altération sensible; le foie est un peu congestionné, mais la vésicule biliaire est de volume normal indiquant par ce fait que malgré la ligature du canal cholédoque, la bile ne s'est pas accumulée : la sécrétion a été vraisemblablement vite tarie sous le développement intensif du vibrion et la résorption consécutive et rapide de la toxine, dont un des principaux effets est de provoquer l'acholie (selles généralement décolorées).

Le mode opératoire : ligature du cholédoque et inoculation intestinale basse présente évidemment quelques difficultés.

Pour ce qui est de l'inoculation intestinale, il est évident que la méthode pratique serait de faire ingérer le vibrion *per os*; mais avec le lapin comme animal d'expérience, nous avons vu que le problème était théoriquement irréalisable, puisque le choléra ne peut se développer dans l'intestin qu'au-dessous du canal de Wirsung. Nous avons cherché à user d'artifices tels que le vibrion soit déposé en ce lieu récepteur, et saute toute la zone négative, soit par des ingestions en quantité massives de vibrions permettant à quelques-uns d'entre eux de gagner la zone positive, soit par leur introduction dans des capsules de gluten et leur libération par le suc pancréatique ; mais ces deux procédés sont incertains. Il nous semble préférable de renoncer au lapin comme animal d'expérience courante, par les raisons mêmes qui le rendent très intéressant pour déterminer les grandes lignes de la pathogénie de la maladie asiatique.

En ce qui concerne la ligature du cholédoque, il y aurait évidemment tout intérêt pour simplifier l'opération, à injecter sous la peau ou dans les veines, une substance qui arrêtât pendant quelques heures la sécrétion biliaire.

Mais le physiologiste n'a à sa disposition aucun corps capable d'arrêter électivement, longuement et avec inocuité la sécrétion biliaire. Il semble que le foie qui joue un rôle défensif si prononcé dans l'organisme soit précisément en dehors de l'atteinte des corps qu'il a charge d'éliminer. S'il vient à faillir à cette fonction, l'organisme succombe. Et de fait dans le département des toxines, nous trouvons une substance ayant un pouvoir électif sur la suppression de la sécrétion biliaire : c'est précisément la toxine cholérique.

Injectons dans les veines d'un lapin, de la toxine cholérique (1) mais à une dose bien inférieure à la dose mortelle; inoculons ensuite du vibrion dans l'intestin au lieu d'élection, c'est-à-dire après le canal de Wirsung : l'animal meurt d'attaque cholériforme typique analogue à celle provoquée par la ligature du cholédoque.

Nous nous trouvons donc en face de ce fait un peu paradoxal d'une affection dont l'évolution est provoquée par elle-même. Il en est du choléra comme de la fièvre qui crée la fièvre, ou de la bile qui fait sécréter la bile.

On peut entrevoir ainsi le cycle vibrionien dans l'intestin : des vibrions ont été ingérés par l'organisme et ont gagné la portion subpancréatique de l'intestin grêle; grâce au ralentissement ou à l'arrêt même momentané de la sécrétion biliaire, le vibrion se développe activement; il élabore de la toxine qui résorbée par la circulation arrive au contact du tissu hépatique et là, suspend la sécrétion biliaire. Le vibrion peut alors se développer en toute sécurité, descendant l'intestin grêle favorable à son développement et maintenant amorcé, le remontant d'autre part jusqu'au pylore, n'y trouvant plus d'obstacle.

Ceci explique le développement intense et rapide du vibrion dans l'intestin, maintenu continuellement à l'écart tant que dure la persistance d'une bonne sécrétion biliaire, et déterminant le choléra foudroyant, tant sont favorables les conditions dans le milieu chaud, humide, alcalin et peptonisé de l'intestin, lorsque la sécrétion hépatique vient à être modifiée.

Ceci tend à montrer la différence des phénomènes *in vivo* et *in vitro*.

(1) Cf. Salimbeni, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1908.

La bile *in vitro* est pour le vibrion cholérique un bon milieu de culture, quoique à l'état pur il soit manifestement inférieur à ceux que l'on emploie dans les laboratoires (eau peptonée, milieu de panse, etc.).

Le suc pancréatique pur alcalin *in vitro* permet également le développement des vibrions cholériques.

Nous ignorons l'action de ces sucs sur le vibrion, *in vivo*, leur action complète sur les terminaisons nerveuses, sur les cellules et les glandes de la muqueuse intestinale, sur les vaisseaux qui entourent la muqueuse, sur le contenu intestinal, aliments, autres diastases et flore microbienne. On a seulement déterminé le rôle des diastases vis-à-vis du vibrion en se basant sur leur caractère de réaction acide ou alcaline.

Mais nos résultats expérimentaux restent : chez l'être vivant, la suppression d'une des diastases, la bile, la conservation de l'autre, le suc pancréatique agissent favorablement sur le développement du vibrion. Dans l'intestin grêle, là où l'action biliaire est épuisée ou neutralisée, là où l'action pancréatique est à son optimum, en ce point d'élection est le berceau du choléra.

Chez le chien et le singe dont les voies biliaires et pancréatiques affectent une disposition très analogue à celle de l'homme, on déterminera l'attaque cholérique par la ligature du cholédoque et l'injection des vibrions un peu bas dans le duodénum.

Il s'ensuit que la réceptivité d'un organisme au choléra sera la conséquence, non pas de la composition humorale ou tissulaire de cet organisme, mais plus volontiers de la disposition anatomique de ses glandes digestives et de leur particularité de sécrétion.

Nous disons « réceptivité » et non « sensibilité », car d'après les expériences précédentes il paraît évident que tous les sujets et tous les animaux de laboratoire sont également sensibles. La « réceptivité » c'est-à-dire l'imperfection des barrières naturelles qu'offre l'organisme, conséquence des dispositions anatomiques ou de formations physiologiques différentes varient seules : nous avons donné à un jeune fox-terrier de 3 kilogrammes et par ingestion, jusqu'à un litre de bouillon de vibrions cholériques en l'espace de 48 heures : il n'en éprouva aucun malaise; le

même bouillon inoculé à la dose de 1 cent. cube dans le duodénum, après ligature du cholédoque, tue l'animal.

Il est plausible d'admettre d'après cela que l'animal qui présentera cette double caractéristique : 1° d'avoir les canaux sécréteurs de la bile et du suc pancréatique très haut dans le tube digestif ; 2° d'avoir une sécrétion biliaire discontinue, se présentera dans les conditions les plus favorables pour permettre la culture des vibrions cholériques. De telles conditions se trouvent réalisées chez l'homme dont l'organisme est, on le sait, de beaucoup le plus réceptif aux vibrions cholériques.

En effet, la sécrétion biliaire chez l'homme est rémittente, avec exagération au moment de la digestion. Mais la bile qui est sécrétée en dehors de la digestion s'accumule dans la vésicule, d'où elle est excrétée lorsque le contenu acide de l'estomac vient toucher l'orifice du canal cholédoque, tandis que l'attouchement avec un liquide alcalin est presque sans effet. Il y aura donc deux périodes dans l'organisme : l'une de sécrétion abondante, l'autre de repos, périodes ayant leur retentissement sur le développement du vibrion.

Il en résulte que tout ce qui provoque un trouble intestinal (1) avec retentissement hépatique, tout ce qui surchargera le foie, entravant son bon fonctionnement ou neutralisant sa bile, facilitera la culture du vibrion de Koch et par suite favorisera l'éclosion du choléra.

Les nombreuses expériences que nous avons faites sur les lapins, sur les chiens et précédemment sur les singes, les constatations faites chez l'homme conduisent également à cette conclusion :

Le vibrion cholérique ne se développe primitivement que dans une zone déterminée de l'intestin que nous avons appelée « zone sensible ».

Il ne se développe que si cette zone est indemne de tout suc biliaire.

Une des défenses naturelles de l'organisme humain contre le choléra résidera donc dans le jeu intégral des sécrétions du foie.

(1) H. Potievin et H. Violle, Choléra expérimental chez le Singe. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 1913.

Résumé des expériences d'inoculation du vibrion cholérique chez le lapin.

ACTION SUR LES VOIES BILIAIRES	ACTION SUR LE PANCRÉAS	LIEU D'INJECTION DU VIBRION CHOLÉRIQUE	RÉSULTATS
1. Ligature du canal cholédoque.	. . . . .	1 à 2 cent. en aval du canal de Wirsung.	† † † † † † † † † —
2. Ligature du canal cholédoque.	. . . . .	1 à 2 cent. après le canal cholédoque.	† + + + + +
3. Ligature du canal cholédoque.	. . . . .	. . . . .	+ + + + + +
4.	. . . . .	Au niveau du canal de Wirsung.	— — —
5.	. . . . .	30 cent. en aval du canal de Wirsung.	† — —
6.	. . . . .	Dans le canal de Wirsung.	† — — —
7.	. . . . .	Avant et après le canal de Wirsung.	— —
8.	Destruction du pancréas.	Entre le choléd. et le can. de Wirsung.	† — —
9.	Destruction du pancréas	20 cent. en aval du canal de Wirsung.	— —
10.	Destruction du pancréas	. . . . .	— —
11. Ligature du cholédoque . . .	Destruction du pancréas	1 à 2 cent. en aval du can. de Wirsung.	† †
12. Ligature du canal cholédoque.	Ligature du canal de Wirsung. . .	1 à 2 cent. en aval du can. de Wirsung.	† †
13. Inj. de tox. dans chol. et veines.	. . . . .	1 à 2 cent. en aval du can. de Wirsung.	† †
14. Inject. de tox. d. cholédoque.	. . . . .	1 à 2 cent. en aval du can. de Wirsung.	— —
15. Injection de tox. dans les veines.	. . . . .	1 à 2 cent. en aval du canal de Wirsung.	†
16.	Inject. de sécrétine dans les veines.	1 à 2 cent. en aval du can. de Wirsung.	— —
17. Vidange de la vésic. biliaire.	. . . . .	En amont et en aval du c. de Wirsung.	— —

† Mort de choléra. + Mort d'une affection autre que le choléra. — Vivant.

RECHERCHES COMPLÉMENTAIRES
SUR LA
CONTAGION TUBERCULEUSE AUPRÈS DU MALADE, ET EN DEHORS DE L'HABITATION

par P. CHAUSSÉ.

(TROISIÈME MÉMOIRE)

Les diverses méthodes d'investigation que nous avons employées jusqu'ici nous conduisent à admettre que la contagion tuberculeuse s'effectue exclusivement, ou presque exclusivement, par les particules sèches; voici, du reste, en quelques mots, quelles ont été nos principales constatations :

1° La vitalité du bacille tuberculeux est suffisante, dans les conditions de l'appartement, pour permettre la transmission de la tuberculose par les crachats desséchés (1);

2° Le brossage d'habits souillés nous a permis de communiquer la maladie au cobaye, avec la plus grande facilité (2);

3° La simple agitation de linges bacillaires mobilise également une quantité importante de particules sèches respirables et virulentes (3);

4° La salive et les crachats tuberculeux sont très difficilement pulvérisables par les courants aériens (Conclusion de notre premier mémoire, ces *Annales*, 25 juin 1914);

5° Le tuberculeux ne projette que très exceptionnellement des particules liquides d'origine buccale, relativement volumineuses, qui tombent à une faible distance et ne sont pas respirables (Conclusion de notre second mémoire ; 25 juillet, 1914);

6° L'inhalation directe, par le cobaye, de l'air expiré par le tuberculeux au moment de la toux, ne communique pas la tuberculose (Conclusion de notre second mémoire).

(1) *Revue de la tuberculose*, 5 octobre 1913.
(2) *Bull. Acad. de médecine*, 13 mai 1913, et *Revue d'hygiène*, 20 mai 1913.
(3) *Bull. Acad. de médecine*, 22 juillet 1913, et *Revue d'hygiène*, 20 octobre 1913.

Toutes nos recherches tendent donc à réfuter la thèse de la contagion par les gouttelettes, tandis que simultanément elles confirment la conception de la transmission par les poussières.

Pour terminer notre travail d'ensemble relatif à la contagion tuberculeuse, il nous reste à publier quelques expériences faites auprès du malade. Diverses questions restent encore en suspens : 1° quelle est l'importance du danger? Nous l'apprécierons par le résultat d'épreuves de cohabitation de cobayes avec des phtisiques atteints de tuberculose dite ouverte; 2° quelle est l'origine principale de ce danger? Nous essaierons de nous en rendre compte par plusieurs méthodes.

ÉPREUVES DE COHABITATION DE COBAYES AVEC LES MALADES

Notre très honoré maître, M. le professeur Letulle, chef de service à l'hôpital Boucicaut, a bien voulu nous permettre de poursuivre cette partie de nos recherches dans les salles de tuberculeux confiés à ses soins; ces recherches n'auraient pu être exécutées en l'absence des encouragements de ce maître si dévoué au progrès scientifique; nous lui exprimons notre bien vive reconnaissance pour la bonté inoubliable dont il a fait preuve à notre égard.

Conditions hygiéniques des salles de tuberculeux à l'hôpital Boucicaut. — L'hôpital Boucicaut est, comme on le sait, de construction moderne. Le pavillon des tuberculeux est séparé en deux moitiés, l'une pour chaque sexe; et chacune de ces parties comprend elle-même une salle commune de 30 à 40 lits, et plusieurs petites salles d'isolement de 1 ou 2 lits.

Les conditions hygiéniques sont les mêmes dans la salle commune et dans les petites salles : éclairage parfait, aération abondante; le sol, carrelé au grès cérame, est lavé tous les matins; la literie, d'un modèle unique et très simple, est d'un nettoyage facile.

La salle commune des hommes est d'une capacité de 1.104 mètres cubes ; elle contient généralement 32 malades, ce qui représente un volume d'air de 34 mètres cubes par malade; mais, en réalité, la quantité d'air de chacun est bien

supérieure à ce chiffre parce que, sur l'un des côtés de la pièce, les fenêtres sont continuellement ouvertes.

Il y a deux rangées de lits, deux latérales et deux centrales, dans le sens de la longueur (voir photographie et figure schématique).

En dehors de l'usage du crachoir il n'est pas pris de précautions spéciales à l'égard des expectorations. Le récipient qui reçoit ces produits contient une certaine quantité d'acide phénique; il est changé aussi souvent que cela est nécessaire, mais au moins tous les matins.

Les malades possèdent un mouchoir qu'ils utilisent pour s'essuyer les lèvres et qu'ils déposent sous l'oreiller ou le traversin ; ce mouchoir leur appartient souvent en propre ; ils le lavent eux-mêmes ou le donnent à laver dans leur famille. Nous démontrerons plus loin qu'il y a là une cause importante de dissémination de poussières virulentes sèches, bien que cette dissémination ait été niée par Sticher, puis Beninde, élèves de Flügge. Ajoutons à cela que, forcément, pendant la toux, il y a projection de quelques grosses gouttelettes sur le linge du malade ou sur le lit.

Néanmoins, les soins quotidiens de propreté dont les salles sont l'objet, le changement assez fréquent du linge (toutes les semaines), la récolte et la destruction des expectorations, la perte de la virulence des crachats en 10 à 20 jours lorsqu'ils sont desséchés, nous paraissaient devoir éliminer presque entièrement le danger de transmission par les poussières.

Exp. I (salle commune). — Nous nous sommes d'abord rendu compte de l'état bacillaire général en examinant les crachats de tous les malades ; voici quelques-unes des teneurs de ces crachats en bacilles, rapportées au milligramme de produit humide :

1.000	26.000	47.000	98.000
8.000	32.000	52.000	104.000
10.000	33.000	65.000	110.000
12.000	35.000	80.000	125.000
14.000	42.000	90.000	135.000
16.000	45.060	95.000	160.000

Les malades étaient placés dans la salle, sans affectation particulière pour les plus riches ou les moins riches en bacilles. Au cours de l'expérience plusieurs malades sont décédés; d'autres ont été admis, et l'état bacillaire général n'a pas varié d'une manière appréciable.

Notre expérience a consisté à laisser séjourner pendant 34 jours, dans cette salle, de façon permanente, une cage contenant 13 cobayes. Cette cage était

déposée au milieu de la pièce, sur une table haute de 1 mètre. A côté de la table portant les cobayes, était un malade dont les mucosités étaient des plus riches en bacilles (125.000), et qui toussait énormément.

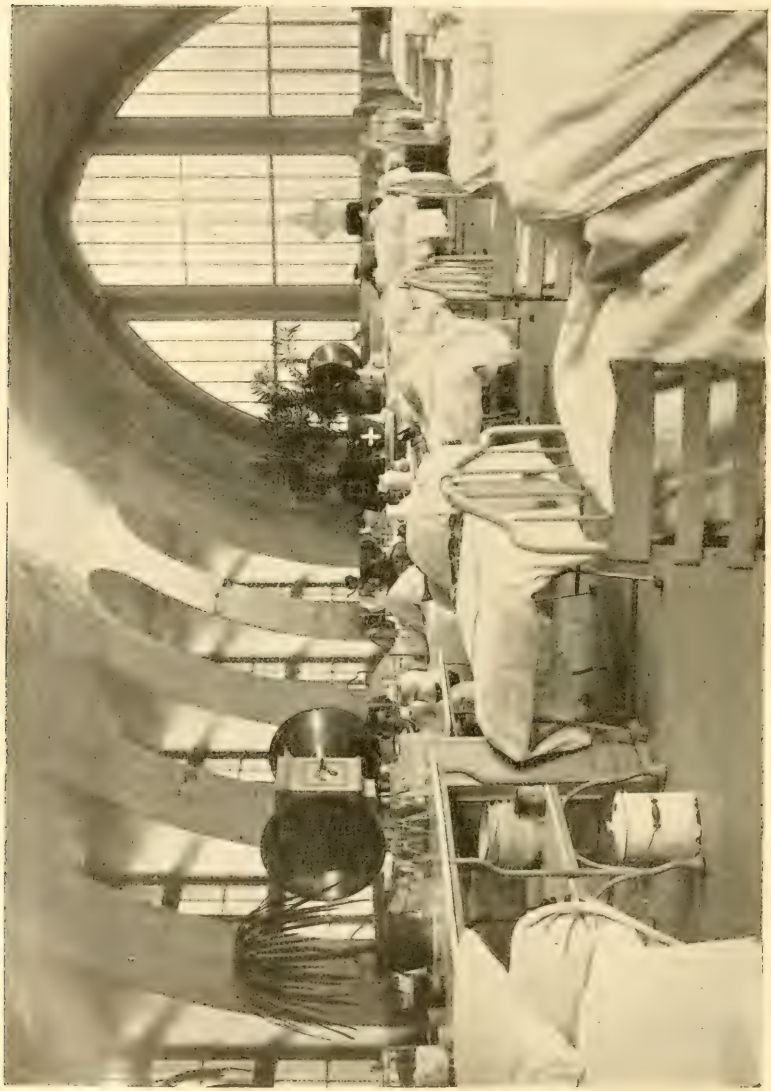


Fig. 1. — La salle commune des tuberculeux hommes à l'hôpital Boucicaut; au centre, une croix blanche indique la table sur laquelle ont séjourné les cobayes.

Pendant toute la durée de leur séjour, commencé le 11 juillet 1912 et terminé le 14 août suivant, les animaux sont restés en bonne santé apparente. Après la fin de l'expérience, ils ont été conservés un certain temps afin que les tubercules ayant pu être contractés pendant les derniers jours de la

cohabitation aient le temps de se développer. Il faut environ 18 jours pour que des tubercules d'inhalation commencent à être visibles à l'œil nu ; pour plus de certitude, à part trois sujets qui sont morts d'affection intercurrente, les autres ont été sacrifiés 35 jours après leur sortie de l'hôpital.

Les trois premiers sujets sont morts les 18 et 19 août, soit 38 et 39 jours après le début de l'expérience ; ils étaient sains en apparence ; leurs poumons ont été prélevés aseptiquement, broyés et inoculés sous la peau de deux cobayes neufs pour chacun ; ces derniers animaux sont restés sains.

Les 10 autres cobayes ont été sacrifiés le 18 septembre, c'est-à-dire 69 ou 35 jours après le début ou la fin de l'expérience ; ils étaient tous parfaitement sains et en bon état général.

Après ce délai de 35 jours, l'inoculation du poumon était inutile, puisque tout bacille isolé et virulent, arrivé dans le poumon, aurait déjà produit un tubercule caséeux avec adénopathie, correspondante et que, de plus, la généralisation aurait été apparente.

Le résultat de cette première expérience est donc entièrement négatif.

Exp. II (salle de deux lits). — Nous avons fait, parallèlement à la précédente, une autre expérience qui fut commencée le même jour, et terminée de même, dans une salle de deux lits.

Dans cette chambre d'une capacité de 60 mètres cubes, étaient deux malades. L'un de ces malades, présentant environ 120.000 bacilles par milligramme de crachats, restait continuellement alité ; l'autre, ayant 50.000 bacilles par milligramme, se levait une partie du jour.

En présence de ces deux malades, nous avons placé deux cages contenant chacune 7 cobayes ; chaque cage était posée sur une table de 80 centimètres de hauteur, près du lit, et à une distance de 80 centimètres ou de 1 mètre de la bouche du malade, selon la position prise par celui-ci (voir figure 3).

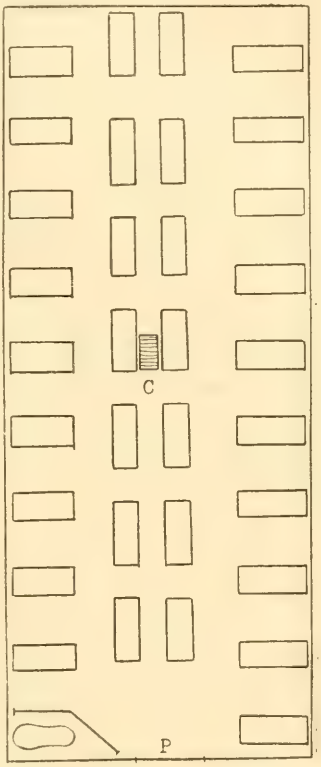


Fig. 2. — Plan schématique de la salle commune des tuberculeux hommes, à l'hôpital Boucicaut.

Chaque rectangle représente un lit. — C, la cage à cobayes placée au centre de la salle, sur une table, entre deux lits ; P, porte d'entrée dans la salle.

Dans cette pièce, la baie était toujours ouverte ou entr'ouverte ; de plus, la porte donnant dans le couloir était fréquemment ouverte jour et nuit, ce qui assurait une ventilation importante.

Vers le milieu de l'expérience, le 27 juillet, le malade le plus riche en bacilles, occupant le lit n° 23, mourut d'hémoptysie. Nous fîmes venir alors dans la chambre deux autres malades possédant respectivement 75.000 et

135.000 bacilles par milligramme de mucosités et qui restaient constamment alités. L'expérience se poursuivit dans les mêmes conditions que précédemment, cette fois jusqu'à la fin, c'est-à-dire jusqu'au 14 août inclusivement. Ces deux derniers malades sont décédés peu de temps après, l'un le 30 août, l'autre le 6 septembre.

Deux cobayes ont péri les 2 et 4 septembre, c'est-à-dire 19 et 21 jours après la fin de l'expérience; ils étaient en apparence indemnes de tuberculose; leurs poumons furent inoculés à quatre cobayes, avec résultat négatif.

Les 12 cobayes restants furent sacrifiés le 18 septembre, soit 69 et 35 jours après le début ou la fin de l'expérience. Sur ce nombre, 11 étaient parfaite-

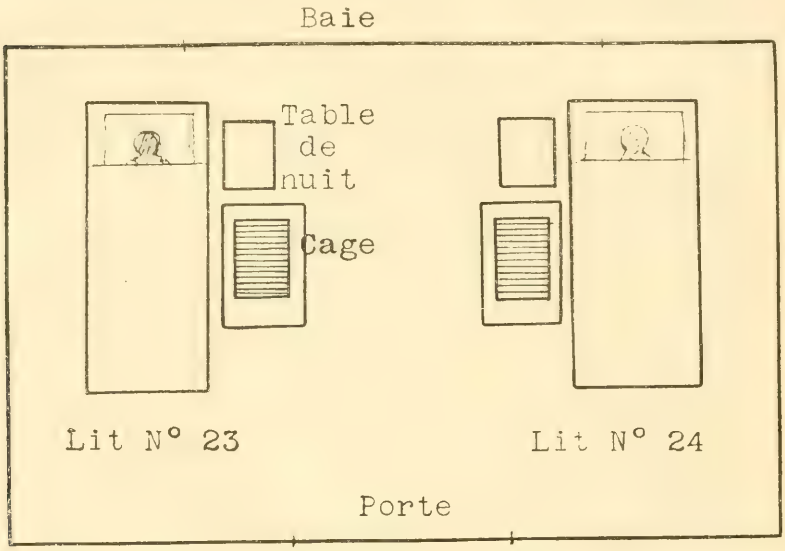


Fig. 3. — Plan schématique d'une petite chambre de deux lits à l'hôpital Boucicaut.

On voit les deux cages, contenant chacune 7 cobayes, placées à 80 cent. cubes ou 1 mètre de la tête du malade, chacune sur une table.

(Exp. II. — Echelle : environ 1/50.)

ment sains; un seul présentait *un tubercule pulmonaire caséeux avec adénopathie correspondante* très marquée et des lésions de généralisation récente; les ganglions cervicaux et mésentériques de cet animal étaient normaux. *Il s'agissait donc d'une tuberculose d'inhalation pure*, remontant à 40 jours environ, c'est-à-dire que cet animal avait été infecté quelques jours avant la fin de la cohabitation.

Exp. III (chambre de deux lits). — Cette expérience a été faite pendant l'hiver 1912-1913, dans une chambre contenant deux malades à la troisième période, avec expectorations riches en bacilles : 1° Cr..., trente-quatre ans, atteint de laryngite tuberculeuse depuis 2 mois et demi; 71.000 bacilles par milligramme de crachats; 2° Hag..., vingt ans, également atteint de laryngite; 63.500 bacilles par milligramme de crachats. Tous les deux expectorent abondamment.

Deux cages contenant chacune 8 cobayes sont posées sur le sol carrelé, entre les deux lits, à 2 mètres ou 2m50 de la tête des malades (voir figure 4 ci-dessous).

L'expérience, commencée le 5 décembre 1912, à 10 heures du matin, est terminée le 4 janvier 1913, à la même heure, soit exactement 30 jours après. Le séjour des cobayes dans la chambre est continu.

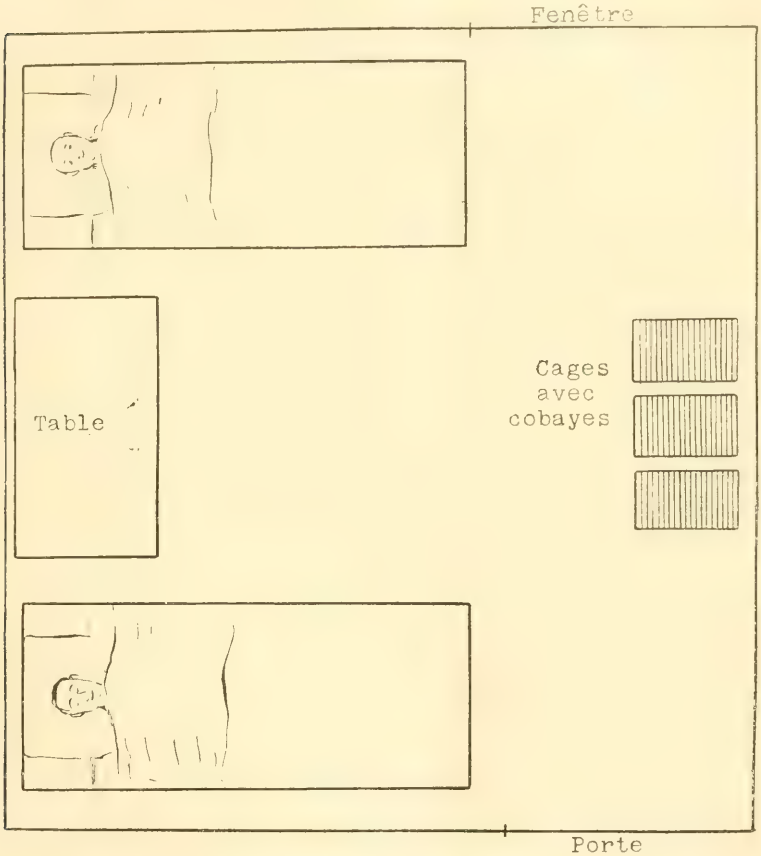


Fig. 4. — Plan schématique d'une chambre de deux lits, de 41 mètres cubes, utilisée dans les expériences III, IV et V. (Echelle : 1/25 environ.)

Il convient de noter que, pendant la saison d'hiver, la porte de la chambre est fermée; la fenêtre, ouverte le jour, est presque entièrement fermée la nuit. La ventilation est donc beaucoup moins abondante que pendant l'été; il en résulte que les conditions sont certainement plus favorables à la contagion.

Deux cobayes périssent les 3 et 7 février suivants; *ils sont tuberculeux avec chacun un nodule primitif caséeux*, de fortes adénopathies et des lésions

de généralisation. L'infection remonte environ à 45 jours pour l'un et à 50 ou 60 jours pour l'autre.

Les 14 autres cobayes sont sacrifiés le 8 février, soit 65 ou 35 jours après le début ou la fin de l'expérience; *sur ce nombre* 8 *sont tuberculeux* avec des lésions de type respiratoire, comme les précédents, et remontant à 35-50 jours environ.

En résumé, sur 16 cobayes ayant cohabité avec les deux malades, il y a 10 tuberculeux. Pour l'un de ces animaux il y a doute quant au mode d'infection, bien qu'il s'agisse vraisemblablement de tuberculose d'inhalation; mais, pour 9, nous sommes en présence de *tuberculose d'inhalation pure.*

Exp. IV (chambre de deux lits). — Cette expérience est exécutée en même temps que la précédente, dans une chambre contiguë semblable, les autres conditions étant les mêmes. Les deux malades occupant cette chambre étaient à la même période de la maladie que les précédents : 1° Leg..., vingt-cinq ans, laryngite tuberculeuse, 35.000 bacilles par milligramme de crachats; 2° Sig..., trente-cinq ans, laryngite tuberculeuse, 62.000 bacilles par milligramme de crachats.

Un cobaye périt le 27e jour : il est sain. Les 13 autres, retirés le 4 janvier de l'hôpital, sont sacrifiés le 8 février suivant, c'est-à-dire, comme précédemment, 65 ou 35 jours après le début ou la fin de la cohabitation. Sur ce nombre, 4 *sont tuberculeux avec des lésions de type respiratoire* remontant à 35, 40, 45 et 60 jours environ.

Les deux malades dont il s'agit sont décédés quelques semaines après : ils présentaient à l'autopsie des lésions thoraciques prononcées et des ulcères laryngiens.

Exp. V (chambre de deux lits). — Exécutée dans les deux chambres précédentes que les malades occupaient alternativement, pour une raison qui sera indiquée plus loin, cette expérience a eu lieu du 26 février au 5 avril 1913; les conditions d'aération et autres sont les mêmes que précédemment.

Les malades ayant séjourné dans la chambre avec les cobayes sont :

1° Cr..., du 26 février au 4 mars; 71.000 bacilles par milligramme de crachats; c'est l'un des malades de l'expérience précédente;

2° Leg..., du 26 février au 3 avril; 35.000 bacilles par milligramme; a également servi pour l'expérience IV;

3° Dum..., du 6 mars au 5 avril, en remplacement de Cr...; ce malade a environ 50.000 bacilles par milligramme et il est atteint de tuberculose du larynx.

19 cobayes ont cohabité avec ces malades du 26 février au 5 avril, soit pendant 38 jours consécutifs.

L'un des cobayes périt le 7 avril, soit 41-2 jours après le début ou la fin de l'expérience; *il n'est pas tuberculeux.*

Un second cobaye périt le 18 avril (52-13 jours); *il a* 2 *tubercules pulmonaires primitifs* et l'infection date de 45 à 50 jours.

Un troisième cobaye est sacrifié le 26 avril (60-21 jours); *il a un tubercule pulmonaire primitif* et l'infection remonte à 45 jours environ.

Les 16 autres cobayes sont sacrifiés le 8 mai, soit 72 ou 33 jours après le début ou la fin de l'expérience; 13 *sont tuberculeux avec* 1 *à* 3 *tubercules pulmonaires primitifs*; *tous ont des lésions d'inhalation pure*; les ganglions pha-

ryngiens et intestinaux sont indemnes : l'ancienneté de l'infection correspond bien à leur séjour à l'hôpital.

Au total, *sur 19 cobayes il y a 15 tuberculeux infectés par inhalation.*

En résumé, les expériences de cohabitation avec le malade nous ont donné :

Exp. I, sur 13 cobayes exposés.		0 tuberculeux.
Exp. II, sur 14 cobayes exposés.		1 tuberculeux.
Exp. III, sur 16 cobayes exposés.		10 tuberculeux.
Exp. IV, sur 14 cobayes exposés.		4 tuberculeux.
Exp. V, sur 19 cobayes exposés.		15 tuberculeux.
Totaux.	76	30

Les expériences I et II semblent avoir été moins inquiétantes, dans leurs résultats, pour l'unique raison qu'elles ont eu lieu en été, saison pendant laquelle l'aération est plus grande, le virus suspendu en l'air est dilué, chassé en grande partie à l'extérieur, et conséquemment le danger de transmission par inhalation est considérablement diminué; nous dirons même que ce danger n'est pas alors ce qu'il est réellement au domicile du tuberculeux où l'aération est en général beaucoup moindre. Ce sont donc vraiment les trois dernières expériences qui nous renseignent le plus exactement sur les chances d'infection qui se rencontrent communément dans la cohabitation avec le malade.

Quoi qu'il en soit, en totalisant nos résultats, nous trouvons que 30 cobayes sur 76, soit 39,47 p. 100, ont été infectés après environ un mois de cohabitation! Nous devons considérer enfin que l'homme inhale, dans les mêmes conditions, 100 fois plus d'air et de bacilles que nos animaux d'expérience; d'où il résulte qu'un être humain ne peut cohabiter avec un phtisique ainsi entretenu, *sans réaliser environ un tubercule pulmonaire chaque jour!* Il est bien entendu que l'évolution de cette lésion théorique est subordonnée à d'autres conditions. Nous n'avons pas moins là l'explication de la proportion considérable des tuberculoses latentes, et aussi celle des tuberculoses cliniquement caractérisées et mortelles.

Ces épreuves de cohabitation ont un autre intérêt au point de vue pathogénique : depuis plusieurs années, nous défendons cette thèse que la phtisie humaine « se respire », tout comme

la maladie bovine, et même davantage, et qu'elle « s'avale » exceptionnellement. Nous venons d'en avoir une nouvelle démonstration : sur 30 cobayes infectés, à part un dont les lésions étaient douteuses, mais vraisemblablement d'origine respiratoire, 29 présentaient incontestablement de la *tuberculose d'inhalation pure, telle que nous la réalisons expérimentalement à volonté, avec des doses infimes de virus naturel.*

Il n'est pas nécessaire d'insister davantage sur l'interprétation qui doit être faite de ces épreuves de cohabitation.

VIRULENCE DES POUSSIÈRES DES CHAMBRES RECHERCHÉE PAR INOCULATION

Ayant constaté l'infection des cobayes par cohabitation avec nos malades, il était indiqué de se rendre compte si les poussières, recueillies en divers points des salles de tuberculeux, étaient virulentes. Sachant aussi que la virulence par inoculation sous-cutanée est la plus facile à mettre en évidence, nous avons voulu d'abord faire une série d'épreuves par ce moyen.

Pour récolter les poussières nous avons employé des boîtes de Petri stériles; nous déposions dans ces boîtes environ 20 cent. cubes d'eau bouillie destinée à fixer les poussières et à empêcher l'atténuation du bacille de se continuer après son dépôt; nous savons, en effet, par nos recherches sur la vitalité, que la destruction du virus est assez rapide, et que cette destruction est surtout l'œuvre de la déshydratation.

Toutes nos récoltes de poussières ont été faites dans une des chambres de deux lits, occupée par deux phtisiques à la période cavitaire; en réalité, au cours de ces recherches, trois malades ont habité dans la pièce, car, l'un des premiers (Dum...) étant décédé, nous le fîmes remplacer par un autre dans le même état clinique.

Les récipients destinés à recevoir les poussières ont été placés en trois points différents : 1° sur la table, entre les deux lits, dans un cristallisoir découvert, pour éviter des contacts manuels directs; 2° sous les lits, également dans un cristallisoir; 3° sur le mur, près de la tête des malades, mais à 80 centimètres au-dessus (voir figure 5 ci-contre), la boîte

de Petri étant déposée, en outre, dans une cuvette photographique.

FIG. 5. — Dispositif employé pour recueillir les poussières dans une chambre de deux lits.

Sur le mur est suspendue une cuvette contenant une boite de Petri à moitié remplie d'eau stérilisée au préalable.

Pour les récipients placés sous les lits, et pour ceux fixés au-dessus de la tête des malades, la projection directe était évitée à coup sûr; mais, pour ceux ayant séjourné sur la table, cette projection restait possible.

Les boîtes de Petri, devant récolter la poussière, sont restées généralement 4 jours dans la chambre; pendant tout ce temps, elles ont donc pu recevoir les particules mobilisées par les mouvements du malade, les courants d'air, la réfection des lits. Au bout de 24 heures, on constatait toujours, quel que fût l'endroit occupé par le récipient, que la surface du liquide se recouvrait de filaments blancs très fins provenant des linges, et vraisemblablement surtout des draps. Ces filaments étaient donc assez légers pour être portés très au-dessus des malades, et, sans aucun doute, dans toutes les parties de l'appartement.

Après les 4 jours de stationnement indiqué, dans le local, le liquide fut récolté avec les précautions d'asepsie nécessaires; il contenait à ce moment un grand nombre de filaments, si bien que, pour l'homogénéiser, nous dûmes le brasser dans un mortier stérile; la plus grande partie des filaments s'agglutinaient alors, mais la libération des bacilles avait chance d'être plus complète. Pour chaque récipient, le liquide obtenu servit à l'inoculation de 3 cobayes.

Dix-huit échantillons de poussières ont été ainsi recueillis, dont 4 sur la table, 4 sous les lits, et 10 au-dessus de la tête des malades. Sur ce nombre, 7 se sont montrés virulents; ces derniers comprenaient 2 échantillons pris sur la table, 2 sous les lits et 3 au-dessus de la tête des malades. La virulence des poussières a donc été reconnue dans 38, 88 p. 100 des cas; mais, pour chaque échantillon prélevé et virulent, la totalité des cobayes n'ont pas toujours été tuberculisés : sur 50 cobayes inoculés et survivants, 13 ou 26 p. 100 ont contracté la tuberculose.

Ces résultats confirment ceux de Cornet et de B. Heymann; ils nous montrent, de plus, que l'usage du crachoir ne suffit pas pour empêcher la pollution totale d'une salle occupée par un tuberculeux cavitaire.

TABLEAU RÉCAPITULATIF CONCERNANT LES INOCULATIONS DES POUSSIÈRES

ÉCHANTILLONS n°s.	ENDROITS où les poussières ont été recueillies.	NOMS des malades.	NOMBRE de cobayes survivants.	NOMBRE DE COBAYES	
				tuberculeux.	sains.
1	Sur la table.	Dum. et And.	2	0	2
2	Sur la table.	Dum. et And.	3	1	2
3	Snr la table.	And. et Bill.	3	2	1
4	Sur la table.	And. et Bill.	3	0	3
5	Sous les lits.	Dum.	2	1	1
6	Sous les lits.	Dum.	3	0	3
7	Sous les lits.	And.	3	2	1
8	Sous les lits.	And.	2	0	2
9	Au-dessus des malades.	Dum.	3	2	1
10	Au-dessus des malades.	Dum.	3	3	0
11	Au-dessus des malades.	And.	2	0	2
12	Au-dessus des malades.	And.	3	0	3
13	Au-dessus des malades.	And.	3	2	1
14	Au-dessus des malades.	And.	3	0	3
15	Au-dessus des malades.	And.	3	0	3
16	Au-dessus des malades.	Bill.	3	0	3
17	Au-dessus des malades.	Bill.	3	0	3
18	Au-dessus des malades.	Bill.	3	0	3
			50	13	37

En résumé : { 7 échantillons virulents sur 18 ou 38 p. 100.
13 cobayes tuberculeux sur 50 ou 26 p. 100.

La tuberculose communiquée par l'inoculation des poussières a été le plus souvent aussi *une tuberculose à évolution lente*; mais, pour un échantillon au moins, lequel fut recueilli au-dessus d'un malade (Dum...), la maladie avait une évolution subaiguë avec caséification prononcée, dénotant une virulence moyenne des bacilles. Cet état d'atténuation des bacilles rencontrés dans les poussières, prouve également que *ces agents avaient été desséchés un certain temps et qu'ils ne provenaient pas directement de l'organisme*, comme s'il se fut agi de projection liquide récente.

Mentionnons enfin que la tuberculose des cobayes fut toujours en tous points caractéristique, et que l'on découvrit constamment des bacilles de Koch dans les lésions d'inoculation.

Les malades, ayant occupé cette chambre, furent And.., (mort un mois après), Dum... (mort en cours d'expérience),

Bill... (sorti de l'hôpital dans un état grave); les deux derniers se sont prêtés à des épreuves d'inhalation de l'air expiré au moment de la toux, mais le résultat de ces épreuves a été négatif.

VIRULENCE DES POUSSIÈRES DES CHAMBRES RECHERCHÉE PAR INHALATION

La cohabitation de cobayes avec les malades et l'inoculation des poussières recueillies dans les chambres nous ont démontré irréfutablement que l'air véhicule des bacilles; mais nous savons que la virulence par inoculation sous-cutanée n'est pas identique à la virulence par inhalation.

C'est pourquoi nous nous sommes demandé s'il était possible de démontrer expérimentalement que l'infection des cobayes, dans les expériences de cohabitation, est due aux poussières des linges; dans l'affirmative, nous aurions une confirmation intéressante de toutes nos déductions précédentes.

Envisageant cette possibilité, nous avons eu l'idée de réaliser l'expérience suivante :

Disposant de deux chambres contiguës, de deux lits chacune, et de deux phtisiques richement bacillaires, nous avons fait changer ces derniers de chambre tous les soirs à 6 heures; il en résultait que, dans le jour, l'une des chambres était toujours libre. Nous avons exposé deux lots de cobayes à l'infection : 1° Un lot A, comprenant 19 cobayes, se trouvait avec les malades d'une manière permanente; il les suivait tous les soirs, au moment du changement de chambre; un lot B, comprenant 18 cobayes, ne se trouvait jamais avec les malades, mais il était exposé à la cause d'infection résultant des poussières des chambres; pour cela nous le faisions apporter tous les matins à 7 heures dans la chambre libre depuis la veille, et, en présence de ce lot de cobayes, on procédait au nettoyage de la chambre et à la réfection des lits. Le soir, un peu avant le retour des malades, le lot B était remporté au laboratoire où il passait la nuit : le lendemain matin, ce lot B était rapporté dans la chambre occupée la veille, etc. (fig. 6).

Cette expérience se confond en partie avec l'expérience V de

cohabitation ; cette dernière comprend en effet le lot A, et nous en avons indiqué le résultat.

En opérant ainsi, nous n'avons pas manqué d'observer que le lot A était exposé toute la journée et toute la nuit à inhaler des particules sèches, car chaque mouvement de l'un ou l'autre des malades pouvait mobiliser des poussières venant des linges de corps ou des draps et couvertures. Pour le lot B, le danger existait à peu près exclusivement pendant le temps où l'on faisait la chambre et les quelques heures qui suivaient ; encore

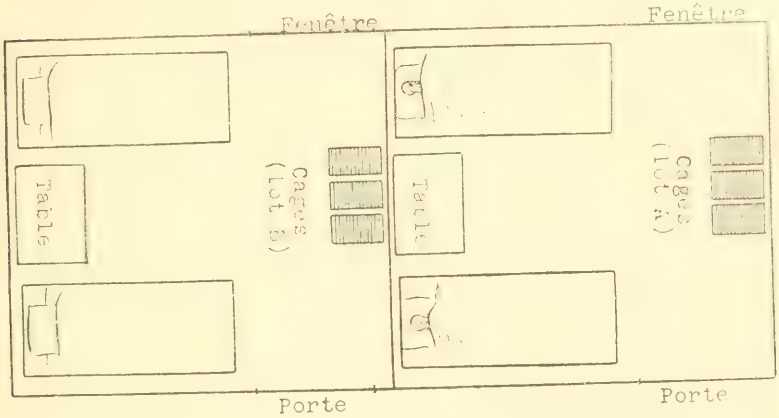


Fig. 6. — Plan schématique des deux chambres (de 41 mètres cubes), contiguës, disposées pour la recherche de la virulence des poussières par inhalation.

(Echelle : 1/50.)

ce danger diminuait-il rapidement dès que les soins habituels du ménage avaient cessé de l'entretenir.

Les chances d'infection étaient donc beaucoup plus faibles pour le lot B que pour le lot A.

Afin de compenser en partie cette inégalité, nous avons prolongé l'épreuve pour le lot B ; tandis que pour le lot A, l'expérience a duré 38 jours, elle a continué pour le lot B, pendant 70 jours.

L'expérience a été commencée le 26 février 1913. D'une manière constante, il y a eu deux malades dans l'une des chambres, mais deux de ces malades étant décédés, nous les avons remplacés par deux autres également bacillaires. Ces malades ont été : 1° Cr..., du 26 février au 4 mars, 71.000 ba-

cilles par milligramme de crachats; 2° Leg..., du 26 février au 3 avril, 35.000 bacilles par milligramme; 3° Dum..., du 6 mars au 7 mai, 50.000 bacilles par milligramme; 4° Dant..., du 8 avril au 7 mai, 80.000 bacilles par milligramme. Tous ces malades avaient des lésions plus ou moins prononcées de laryngite bacillaire.

L'expérience a été terminée le 5 avril pour le lot A, et le 7 mai pour le lot B.

Nous avons vu que le lot A, sacrifié le 8 mai, a donné 15 *tuberculeux sur* 19 *cobayes exposés*. Le lot B, exposé seulement à l'inhalation des poussières de la chambre pendant un temps plus court, a fourni 2 *tuberculeux sur* 18 *cobayes*; ces derniers ont été sacrifiés 35 jours après la fin de l'expérience, c'est-à-dire le 11 juin.

Ce dernier résultat est donc conforme aux précédents; la virulence des poussières, déjà établie par inoculation, est à nouveau démontrée par inhalation, sans qu'on puisse songer à une infection possible par les gouttelettes puisque les animaux de la série B ne sont venus dans les chambres que 14 heures après le départ des malades; or, nous avons constaté que les particules liquides mettent environ 7 heures à se déposer après leur pulvérisation dans l'atmosphère.

ORIGINE DES POUSSIÈRES : DANGER DES MOUCHOIRS

De précédentes recherches nous ont permis de dire que la simple agitation de linges ayant reçu des mucosités de phtisiques suffit à mobiliser des particules respirables. Le linge qui nous semble immédiatement le plus dangereux est, par conséquent, le mouchoir. Nous avons noté que les malades auprès desquels nous avons fait cohabiter des cobayes avaient tous un mouchoir à leur disposition et qu'ils le déposaient sous l'oreiller ou le traversin. Voyons donc jusqu'à quel point le mouchoir, conservé par le tuberculeux, peut communiquer la tuberculose par inhalation.

Exp. I. — Pour cette expérience et la suivante nous avons remis à deux malades deux linges de coton blanc, en les priant de se servir de ces linges

(1) *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 24 février 1913.

comme de mouchoirs, pendant une période de 2 jours. Ce temps écoulé, nous avons retiré les deux linges et les avons conservés à la température de l'appartement et à la lumière diffuse pendant 24 ou 48 heures. Ces linges étaient plus ou moins souillés. Pendant le temps de conservation, il faut noter que les linges n'étaient pas dépliés et étendus, mais « pelotonnés », tels qu'ils se trouvent dans la poche; cette condition est défavorable à la dessiccation, surtout à la température ordinaire.

Le premier linge, utilisé par le malade E. Rec..., présentant 90.000 bacilles par milligramme de crachats purs, a été conservé 24 heures dans notre bibliothèque; ce temps écoulé, il servit pour la présente expérience, qui fut faite le 29 septembre 1912. La caisse 126, à inhalation, étant disposée comme dans nos précédentes épreuves d'agitation de linges (1), nous y avons

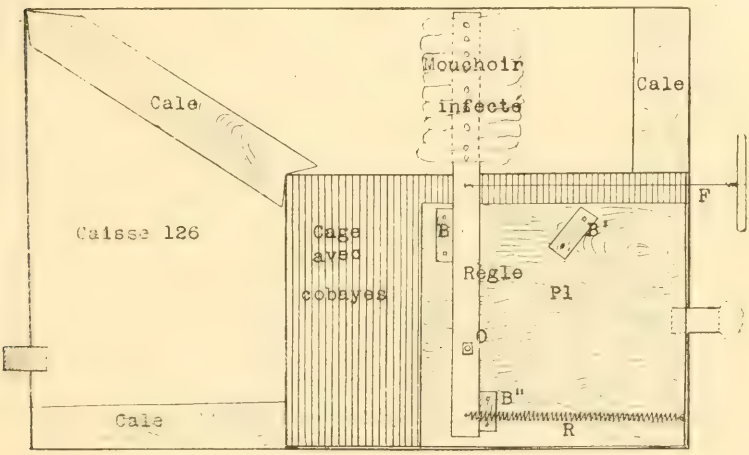


Fig. 7. — *Coupe horizontale de la caisse* 126, *à inhalation*, disposée pour l'épreuve de transmission par agitation de linges bacillaires.

Règle mobile autour du point O, et portant le linge; B, B', B'' : buttoirs: R : ressort de rappel; Pl : planchette-support; F : fil de fer pouvant être tiré de l'extérieur.

placé 6 cobayes; ensuite 200 mouvements d'agitation ont été effectués en 2 minutes environ et les animaux sont restés dans l'appareil pendant 2 heures 30 minutes.

Sacrifiés 23 à 28 jours plus tard, 2 *sujets sur les* 6 *étaient tuberculeux*; ils présentaient chacun un tubercule pulmonaire primitif bien développé avec adénite caséeuse prononcée.

Exp. II. — Faite le 30 septembre 1912, selon la même méthode, avec la compresse-mouchoir d'un malade ayant environ 105.000 bacilles par milligramme de crachats (M. Lef...). Cette compresse, utilisée comme mouchoir pendant 48 heures, a été conservée ensuite un temps égal, « pelotonnée », dans notre bibliothèque.

(1) *Revue d'Hygiène et de Police sanitaire*, 20 octobre 1913.

Six cobayes étant dans la caisse à inhalation, nous exécutons, en 5 minutes environ, 500 mouvements d'agitation du linge; les cobayes inhalent l'air de la caisse pendant 2 h. 30 minutes. Morts ou sacrifiés 19 à 27 jours plus tard *ils ont respectivement* 10, 33, 14, 30, 36 *et* 33 *tubercules pulmonaires primitifs chacun*; comme on le voit, il s'agit-là d'une infection particulièrement intense.

Exp. III. — Exécutée en avril 1913 avec le mouchoir du malade Lef..., dont les crachats contiennent environ 30.000 bacilles par milligramme; ce malade est assez propre.

Dans cette expérience et les suivantes, les mouchoirs ont été pris aux malades d'une façon inopinée, sous prétexte de les faire laver.

Le mouchoir du malade Lef... a été conservé 6 jours avant de servir; pendant le temps de conservation, il était à moitié étalé. En présence de 8 cobayes, nous exécutons 500 mouvements d'agitation en 5 minutes, dans la caisse de 126 litres; les animaux inhalent pendant 1 h. 40 minutes. Sacrifiés 35 jours plus tard, *tous ces cobayes sont sains.*

Exp. IV. — Exécutée également en avril 1913 avec le mouchoir du malade Bar... Ce malade est propre; il a environ 80.000 bacilles par milligramme de mucosité. Le mouchoir est conservé 5 jours dans les conditions ci-dessus.

Nous effectuons 600 mouvements d'agitation; 10 cobayes inhalent pendant 1 h. 45 minutes; sacrifiés 35 jours plus tard, *aucun d'eux n'est tuberculeux.*

Exp. V. — Faite en juillet 1913 avec le mouchoir du malade Soret..., qui présente 95.000 bacilles par milligramme de crachats. Ce mouchoir est conservé 2 jours et demi complètement étendu. Nous réalisons 400 mouvements d'agitation; 6 *cobayes survivants donnent* 4 *tuberculeux* ayant chacun un tubercule pulmonaire primitif; mais ces tubercules sont peu développés et les ganglions correspondants sont modérément hypertrophiés et peu caséeux; il s'agit assurément de tuberculose atténuée par la dessiccation.

Exp. VI. — Faite avec le mouchoir du même malade, en conservant ce linge 2 jours de plus. 400 mouvements d'agitation sont exécutés; les cobayes inhalent pendant 1 h. 50 minutes; sacrifiés 35 jours plus tard, 4 *sujets, sur les* 6, *sont tuberculeux*, chacun avec un tubercule primitif, une adénopathie caséeuse moyennement développée et des lésions de généralisation au début; cette tuberculose est du type atténué.

Exp. VII. — Réalisée en juillet 1915 avec le mouchoir du malade Bon..., dont les crachats contiennent 50.000 bacilles par milligramme; ce malade est propre et me fait savoir qu'il ne crache pas dans son mouchoir. Après 1 jour de dessiccation, étalé, le mouchoir est agité 350 fois; 6 cobayes inhalent pendant 1 h. 30 minutes; *tués après* 35 *jours, ils sont tous indemnes.*

Exp. VIII. — Faite en juillet 1913 avec le mouchoir du malade Danel... qui a 120.000 bacilles par milligramme de crachats; ce mouchoir a été pris à côté de l'oreiller pendant que le malade dormait. Après un jour de dessiccation, complètement étalé, il est agité 300 fois en présence de 9 cobayes qui inhalent pendant 1 heure et demie. Morts ou sacrifiés, 29 à 35 jours après, *tous ces cobayes sont tuberculeux*; ils présentent en moyenne 38 *tubercules pulmonaires primitifs*; les lésions sont bien développées et fortement caséeuses.

Il convient d'observer que ce malade, très sale, a servi pour les expériences V et VI d'inhalation de l'air expiré pendant la toux; tandis que l'expérience VI a donné un résultat négatif, l'expérience V a fourni un cobaye tuberculeux sur 12, avec un tubercule primitif; il est très vraisemblable, avons-nous dit, qu'une particule sèche, provenant de ce malade éminemment contagieux, a été la cause de ce cas d'infection (second mémoire; ces Annales, 25 juillet 1914).

Exp. IX. — Le même mouchoir du malade Danel.... conservé 3 jours de plus, parfaitement étalé, sert pour une nouvelle expérience; celle-ci a donc lieu après 4 jours de dessiccation.

Nous effectuons 350 mouvements d'agitation en 3 minutes, et les 9 cobayes employés inhalent pendant 1 h. 20 minutes. Morts ou sacrifiés, 27 à 35 jours après, *ces 9 animaux sont tuberculeux*, et ils présentent en moyenne 14 *tubercules pulmonaires primitifs*.

Exp. X. — Le même mouchoir, conservé encore 2 jours de plus, dans les mêmes conditions, sert pour une dernière expérience; celle-ci a donc eu lieu après 6 jours de dessiccation, et en été; le linge était parfaitement sec après 24 heures, et l'action atténuante de la lumière diffuse et de la sécheresse s'est prolongée 5 jours de plus.

Nous effectuons 500 mouvements d'agitation; 7 cobayes survivants ont inhalé pendant 1 heure et demie; ces animaux ont été sacrifiés après 35 jours; 6 *sur les* 7 *étaient tuberculeux*, et ils présentaient *en moyenne* 3 *tubercules primitifs*. Il importe de remarquer que ces lésions, ainsi que les adénopathies correpondantes, étaient moins développées qu'avec le virus frais du même malade; dans cette dernière expérience, il s'agissait donc d'un *virus notablement atténué* et sur le point de perdre sa virulence par inhalation.

Le tableau récapitulatif ci-après permet de voir l'ensemble des résultats que nous avons obtenus avec les mouchoirs.

Tout d'abord on remarque qu'il existe de grandes différences, selon les malades, dans le pouvoir tuberculigène des mouchoirs; les malades qui ne font que s'essuyer les lèvres sont les moins dangereux; ceux qui crachent dans leur mouchoir sont très redoutables.

Au total, sur 10 expériences faites avec les mouchoirs, 7 ont donné des résultats positifs; 41 cobayes, sur 73 utilisés et survivants, ont été tuberculisés, en quelques minutes d'agitation, soit environ 56,1 p. 100.

Nous avons constaté d'autre part, en accord avec nos précédentes conclusions sur la vitalité, que le danger des linges diminue assez vite, aussitôt que la dessiccation est réalisée; ce danger tend à devenir nul vers le dixième jour, si la dessiccation est bonne. De plus, nous avons obtenu, dans les expériences V, VI et X, des tuberculoses d'inhalation manifestement atténuées.

TABLEAU RÉCAPITULATIF
DES EXPÉRIENCES FAITES AVEC LES MOUCHOIRS DES TUBERCULEUX.

EXPÉRIENCES nos.	NOMS des malades.	RICHESSE bacillaire des crachats par milligramme.	TEMPS de la dessiccation.	NOMBRE DE COBAYES		NOMBRE MOYEN de tubercules primitifs.	OBSERVATIONS
				sains.	tuberculeux.		
1	E. Rec.	90.000	1 jour.	3	0	1	Malade sale.
2	M. Lef.	130.000	2 jours.	0	6	26	Malade sale.
3	Laf.	30.000	6 jours.	8	0	.....	Malade propre.
4	Bar.	80.000	5 jours.	10	0	.....	Malade propre.
5	Sor.	95.000	2 j. 1/2.	2	4	1	Malade sale.
6	Sor.	95.000	4 j. 1/2.	2	4	1	Malade sale.
7	Bon.	50.000	1 jour.	6	0	.....	Malade propre.
8	Danel.	120.000	1 jour.	0	9	38	Malade sale.
9	Danel.	120.000	4 jours.	0	9	14	Malade sale.
10	Danel.	120.000	6 jours.	1	6	3	Malade sale.
				32	41		
				73			

Nous avons recherché, en outre, s'il était possible de communiquer la tuberculose au cobaye, par inhalation, en se servant des taies d'oreiller des malades, et en opérant comme avec les mouchoirs. Six expériences ont été ainsi faites, avec des taies d'oreillers provenant de malades propres, mais dont les expectorations étaient riches en bacilles (Laf... et Bar...). Les temps de conservation de ces taies ont été de 2, 3 et 4 jours; sur 58 cobayes ayant inhalé, en plusieurs séries, *aucun n'est devenu tuberculeux.*

Avec les torchons ayant servi le matin à faire le ménage, à essuyer les meubles et boiseries, mais non les tables placées à côté des lits, nous avons eu également *quatre résultats négatifs* en procédant par inhalation.

D'où proviennent donc les bacilles contenus dans les poussières des chambres, ces poussières ayant été reconnues virulentes? Ils ne peuvent venir que des mouchoirs, du linge de corps, de la barbe, de la figure et des mains du malade, et, pour une part difficile à apprécier, des linges du lit souillés directement par les projections de salive ou de crachats.

Dans d'autres essais nous avons mis en évidence la virulence des cheveux du malade, par souillure de crachats, notamment pour le malade Danel. Pour 4 malades à la 3e période, nous avons prélevé, après décès, des mèches de cheveux qui ont été lavées à l'eau stérile; ce liquide a été inoculé à quatre lots de 4 cobayes; la virulence a été constatée 2 fois sur 4; mais, dans chaque lot, un seul animal sur 4 inoculés et survivants, est devenu tuberculeux et ses lésions étaient dues manifestement à un bacille atténué par dessiccation.

Les linges du lit ne doivent recéler qu'une quantité relativement faible de bacilles, si on les compare aux mouchoirs; le danger ne devient important que par sa répétition et sa prolongation.

Nous avons bien noté que dans tous les récipients mis dans les chambres, pour recueillir les poussières, il y avait un grand nombre de filaments blancs venant des linges; et que ces poussières étaient virulentes dans plus d'un tiers des cas. Mais il existait en outre des poussières plus fines, car les filaments dont il s'agit n'auraient pu tuberculiser nos cobayes par inhalation, dans les expériences de cohabitation; les dimensions trop grandes de ces filaments s'opposeraient en effet à leur respirabilité.

COMMENT CONCEVOIR LA CONTAGION DANS LES VÉHICULES ET LIEUX PUBLICS

Il n'est nécessaire de faire aucune démonstration pour savoir que plus le virus est dilué, moins les chances de contagion sont grandes; plus les contacts directs ou indirects avec les malades sont répétés, et plus les chances de contamination sont élevées.

Les travaux de Cornet et de quelques autres auteurs montrent que les poussières des rues ne sont pas virulentes. Il résulte d'une statistique de Hirt (cité par Cornet, in *Ueber Tuberkulose*, page 107) que les balayeurs des rues, qui inhalent une grande quantité de ces poussières, ne présentent pas une morbidité tuberculeuse, ni même une proportion d'affections des voies respiratoires, plus élevées que les moyennes. Pareillement Kunz (1900) n'a pu mettre le bacille en évidence avec 20 échantillons de poussières des rues.

Cette innocuité des poussières des rues s'explique aussi par ce que nous avons fait connaître personnellement sur la vitalité du bacille tuberculeux : cet agent pathogène est non seulement dilué, mais il est détruit encore plus rapidement que dans les conditions de l'habitation. Lorsque le sol est sec, la vitalité ne dépasse pas quelques jours ; lorsque le sol est humide, les poussières sont fixées et ne peuvent être inhalées.

Toute cause qui empêche la dilution du virus et retarde l'action atténuante de la lumière et de la dessiccation augmente la nocivité des poussières. La contagion a donc quelques chances de se produire dans les locaux très fréquentés par le public, et cela d'autant plus que la circulation d'air y est moins active, la capacité plus faible, et le sol plus fréquemment souillé par des expectorations.

Toutefois, Cacace (1901) n'a eu que des résultats négatifs avec la poussière des écoles ; Kelsch (1899) n'a enregistré qu'un seul résultat positif avec les poussières des casernements de Lyon ; Gotschlich (1903) ne trouve aucun échantillon virulent sur 119 prélèvements effectués dans les gares ou les maisons de commerce ; la même année, Belli échoue totalement avec 39 échantillons de poussières des vaisseaux de guerre. Cependant, Mitulescu (1902) aurait démontré la virulence des poussières des livres d'une bibliothèque populaire, mais ce résultat nous semble très douteux.

Certains locaux, tels que les bureaux et ateliers, par suite de la proximité de sujets malades et de sujets sains, réalisent en partie les conditions de l'habitation du tuberculeux quant au danger de transmission ; cependant, l'une des plus grandes causes ne s'y trouve pas : l'agitation des linges du lit. Le malade propre ne fera courir à ses voisins qu'un danger insignifiant ; celui qui utilisera un mouchoir souillé de crachats desséchés, et portera des habits également bacillaires qui parfois seront brossés à une faible distance, sera redoutable.

Dans la cohabitation nécessitée par le travail en commun, les chances d'infection deviennent importantes aussi parce qu'elles sont quotidiennement renouvelées.

Il est un lieu public où toutes les conditions semblent réunies pour la transmission de la maladie s'il y a émission de

bacilles, et qui pourra nous servir d'exemple à étudier : c'est le wagon de chemin de fer, spécialement celui qui est le plus mal tenu, c'est-à-dire le wagon de troisième classe et le compartiment de fumeurs.

Praussnitz (1891) rapporte avoir reconnu la virulence de 5 échantillons de poussières sur 20, qui avaient été recueillis dans les wagons de la ligne Berlin-Meran ; cette ligne, fréquentée par des malades, était donc très dangereuse, au moins à cette époque.

Nous avons voulu nous rendre compte du danger des poussières des wagons en faisant des prélèvements dans les compartiments de fumeurs de la ligne de Paris-Versailles. Dans ces compartiments il y a des traces nombreuses d'expectorations ; le nettoyage est insuffisant ; la poussière s'accumule dans tous les endroits tant soit peu inaccessibles au balai ; de plus, le balayage est fait d'une manière habituelle quand les voyageurs occupent déjà les compartiments. Enfin, les trépidations du train en marche mobilisent les particules sèches les plus fines.

Il était donc intéressant de rechercher la virulence des poussières de ces wagons. Pour ce faire, à diverses dates, et dans divers compartiments de fumeurs, nous avons prélevé 11 échantillons de poussières. Chaque échantillon, délayé avec un peu d'eau stérile, a été inoculé sous la peau de 4 cobayes. Une partie des animaux sont morts de complications septiques précoces ; mais, étant donné le nombre des inoculés, nous avons eu des survivants dans tous les lots, c'est-à-dire pour les 11 échantillons de poussières. *Aucun des animaux n'a contracté la tuberculose.*

De ces constatations on ne peut certes pas déduire que les poussières des wagons ne sont pas dangereuses, mais seulement qu'elles sont moins fréquemment virulentes que celles des locaux où séjournent des malades.

Dans les divers véhicules et lieux publics les malades ne font que passer ; les nettoyages sont tout au moins quotidiens. Si des expectorations bacillaires sont déposées sur le sol, c'est d'une manière occasionnelle et en petite quantité. Le danger des poussières des lieux fréquentés par le public n'est certes pas nul, mais il est généralement faible comparé à celui des poussières des locaux occupés par les malades.

Ce qu'il faut plutôt envisager comme cause de contagion dans les rassemblements, c'est la mobilisation des poussières virulentes apportées sur les habits ou répandues par les mouchoirs que l'on déploie en leur faisant subir des froissements; mais c'est là encore un danger qui a peu de chances de se répéter pour la même personne.

CONTAGION D'ORIGINE ANIMALE

Nous ne voulons pas ouvrir ici un long chapitre sur les causes d'infection tuberculeuse d'origine animale. On sait que, selon Behring et quelques autres auteurs, la tuberculose humaine a sa source principale dans le lait et dans la viande.

En 1911 (*Annales de l'Institut Pasteur*, 25 juillet), et tout récemment (*Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 20 octobre 1913), nous avons publié quelques documents qui doivent, pensons-nous, entraîner le rejet de cette hypothèse. En France, la tuberculose bovine n'est pas aussi étendue qu'on le dit généralement : 6 à 20 p. 100 des bovins sont tuberculeux, la plupart avec de faibles lésions. 0,60 p. 100 des porcs sont touchés par la maladie. Si le lait était aussi dangereux que certains le supposent, c'est le veau qui serait tuberculisé le plus fréquemment; or, des recherches que nous avons faites chez cet animal, et qui portent à ce jour sur environ 35.000 sujets, il résulte que la morbidité tuberculeuse du veau est d'environ 1 p. 400; mais, parmi ces animaux, il en est seulement 1 *sur* 6.000 qui *soit infecté par ingestion lactée*. A plus forte raison, l'homme ne peut trouver dans le lait de vache, ce liquide étant le plus souvent ingéré après ébullition, la source habituelle de sa propre tuberculose; il s'agit seulement d'une source d'exception que, du reste, il ne faut pas négliger.

Ces conclusions ont été confirmées au dernier Congrès contre la tuberculose tenu à Rome, en 1912, par Kossel, Gosio, Jatta.

D'autres recherches inédites que nous avons réalisées nous montrent, confirmant en cela les conclusions de divers auteurs, que le muscle des bœufs et porcs tuberculeux généralisés n'est pas virulent par inoculation au cobaye; notons bien qu'il s'agit ici des animaux que nous retirons de la consommation et qui

sont atteints de généralisation sanguine indiscutable. Cette autre origine animale de la tuberculose humaine est donc encore plus rarement exacte que la première.

Tout indique également que l'infection par inhalation d'origine animale, c'est-à-dire par la cohabitation avec des bovins tuberculeux, ne joue aucun rôle appréciable : c'est parmi la population rurale que la tuberculose humaine est le plus rarement observée.

Enfin, les autopsies faites chez l'homme tendent à incriminer l'inhalation comme le mode de contagion presque exclusif ; et nous avons bien constaté, dans nos expériences de cohabitation de cobayes avec les malades, que les sujets tuberculisés présentaient une tuberculose d'inhalation absolument typique et identique à celle que nous obtenons expérimentalement.

Ces divers résultats, qui se confirment mutuellement d'une manière remarquable, font ressortir, autant qu'il est possible, l'intérêt des acquisitions que nous avons faites sur la contagion par inhalation dans l'espèce humaine. Le rôle de ce mode d'infection nous apparaît donc extrêmement important et il est d'une utilité primordiale de savoir dans quelles conditions il se réalise ; est-il besoin de dire qu'en l'absence de connaissances précises sur la contagion on ne saurait faire de bonne prophylaxie ?

Conclusions.

Des recherches précédentes nous croyons pouvoir conclure :

1° La tuberculose humaine est surtout d'origine humaine ;

2° La contagion s'effectue très généralement par inhalation ;

3° Cette contagion est due aux particules sèches d'une manière exclusive ou presque exclusive, la transmission par les particules liquides ne pouvant être envisagée qu'à titre d'hypothèse, comme un mode exceptionnel et peu vraisemblable ;

4° La maladie se contracte principalement dans l'habitation, là où les causes de mobilisation des particules sèches sont réunies au maximum, et le virus où se trouve le plus abondant ;

5° Dans la cohabitation avec le malade, en l'absence de précautions suffisantes contre la dissémination du virus, et bien que la résistance du bacille desséché ne soit que de quel-

ques jours, le danger de transmission est beaucoup plus grand qu'on ne le suppose.

Il est, par conséquent, indispensable de prendre des mesures de prophylaxie et de les généraliser; il ne nous semble pas qu'il soit impossible de les appliquer avec les ménagements nécessaires.

Dans la persistance de la morbidité tuberculeuse à un chiffre élevé il faut voir le résultat de la *contagion libre* et attribuer au terrain le rôle tout à fait secondaire qu'il possède réellement. Notre conviction est que, dans l'avenir, tous les efforts auront pour but d'éviter la contagion et que ce sera là, à coup sûr, la méthode la plus fructueuse.

DU ROLE PHYSIOLOGIQUE JOUÉ PAR LE « BACILLUS BIFIDUS » DANS LE CANAL INTESTINAL

par Carl A. KLING,
Professeur agrégé à l'Institut Carolin de Stockholm.

(Travail du laboratoire de M. E. Metchnikoff.)

C'est une vérité généralement connue que les enfants élevés au sein résistent beaucoup mieux à toutes sortes d'influences nocives que ceux allaités artificiellement. Aussi la mortalité est-elle beaucoup plus considérable parmi ceux-ci que parmi ceux-là. Les troubles de la digestion constituent une des principales causes de la grande mortalité parmi les enfants au biberon, tandis que ces troubles sont relativement rares chez les enfants au sein, et quand ils apparaissent chez eux, ils sont légers et de courte durée. On s'est beaucoup occupé de trouver l'explication de cette véritable immunité chez l'enfant au sein, et nombre d'opinions ont été avancées à cet égard.

Les recherches de ces dernières années sur la flore de l'intestin et son influence ont enfin commencé à jeter une certaine lumière sur cette intéressante question. Lors de ses études sur l'infection cholérique, Metchnikoff (1) constata que, dans le canal intestinal de certains animaux d'expérience, il existe des microorganismes ayant la propriété d'empêcher le développement des *vibrions cholériques*, tandis que d'autres, par contre, favorisent l'apparition de l'infection. En faisant ingérer des cultures de ces bactéries empêchantes, ce savant réussit même à rendre ces animaux résistants à la maladie. S'appuyant sur ces expériences, Metchnikoff se demanda si la résistance de l'homme (et aussi de certains animaux) aux vibrions cholériques n'était pas en relation étroite avec la fréquence normale dans le canal intestinal de microbes, empêchant les vibrions de se multiplier et de provoquer l'infection.

Les recherches de Bienstock (2) sur les facteurs qui empêchent la putréfaction sont d'un grand intérêt pour cette question. Il fit l'observation que le *Bacterium coli* et le *B. lactis aerogenes* paralysent l'action du *Bacillus putrificus* sur les substances albuminoïdes. La présence des bactéries lactiques fait que le lait cru n'est pas susceptible de putréfaction, tandis que le lait stérilisé ne tarde pas à la subir.

Lors de ses études fondamentales sur la flore intestinale chez le nourrisson, Tissier (3) aborda aussi la question du rôle joué par les bactéries intestinales normales. C'est le *Bacillus bifidus*, découvert et décrit par lui, ce microbe prédominant dans l'intestin de l'enfant au sein bien portant, qui y joue le rôle d'une espèce empêchante. Il observa que certaines bactéries gazogènes, comme le *B. coli*, le *Coccobacillus perfœtens* et autres, quand ils croissent en symbiose avec le *Bacillus bifidus*, sont empêchés dans leur production de gaz et qu'après un certain temps ils ne se laissent plus cultiver. Comme le *Bifidus* fermente aussi diverses espèces de sucre en produisant une grande quantité d'acide, Tissier vit dans ce fait la cause pour laquelle ce micro-organisme empêche le développement d'autres microbes moins résistants aux acides.

A la suite de ces recherches, on commença à s'occuper de plus en plus du rôle physiologique joué par les bactéries intestinales.

Ainsi d'après Eijkmann (4), Conradi et Kurpjuweit (5), il y a dans des cultures de bactéries, des substances thermolabiles (autotoxines), qui, tout en exerçant une action empêchante sur le développement ultérieur des cultures, ont aussi la propriété d'empêcher d'autres bactéries de se multiplier. Les deux derniers de ces auteurs ont trouvé de pareilles substances empêchantes aussi dans les fèces de l'homme adulte et considèrent que le *Bacterium coli* est de la plus grande importance pour la formation de ces substances. Prenant ces recherches pour point de départ, Moro et Murath (6) cherchèrent à trouver de pareilles substances aussi dans les fèces de nourrisson. Ils constatèrent que les excréments de l'enfant au sein, aussi bien que ceux de l'enfant au biberon, exercent une action bactéricide sur un grand nombre de micro-organismes, de sorte que les substances empêchantes ont la valeur de sauvegardes naturelles. Ils supposèrent

que le *Bacillus bifidus* est actif lors de la formation de ces substances et essayèrent d'appuyer cette hypothèse expérimentalement ; ils n'y réussirent pas. En revanche ils firent valoir que le *B. coli* est le véritable producteur des substances empêchantes.

Peu de temps après, Rolly (7) chercha à vérifier la découverte d'Eijkmann, de Conradi et de Kurpjuweit, mais il ne put trouver aucune preuve de l'existence de pareilles substances empêchantes ni dans les cultures, ni dans les fèces.

L'étude du rôle joué par les bactéries intestinales dans la physiologie de l'intestin n'est pas encore très avancée, mais les résultats déjà obtenus, quoique en partie contradictoires, sont pourtant intéressants et semblent démontrer que certaines bactéries intestinales de fréquence normale jouent un rôle dans la lutte de l'organisme contre les micro-organismes pathogènes. Cela paraît tout particulièrement le cas du *Bacillus bifidus* qui est l'habitant constant et presque unique de l'intestin de l'enfant nourri au sein et bien portant. Il n'est donc pas sans intérêt de mettre encore à l'étude la question : quel rôle joue le *Bacillus bifidus* pour empêcher l'apparition d'autres bactéries?

Nous nous sommes demandé si une culture du *Bacillus bifidus* exerce une action bactéricide ou empêchante sur certaines bactéries ensemencées. L'espèce de *Bifidus* employée provenait d'un enfant sain, âgé de trois mois et nourri exclusivement avec le lait maternel; il fut cultivé dans une gélose glucosée profonde (1,5 p. 100) selon la méthode employée par Tissier. Le bacille présentait les propriétés indiquées par cet auteur. Pour être à même de déterminer plus exactement son action sur d'autres microbes, il convient de se servir d'un milieu liquide de culture. Le *Bacillus bifidus* pousse bien dans le bouillon ordinaire qu'on additionne de 1 1/2 p. 100 de glucose, pourvu que la culture soit anaérobie. Dans toutes les expériences qui suivent, nous nous sommes servi d'une telle culture en bouillon. Dans des échantillons prélevés sur le liquide de culture, le nombre des bactéries ensemencées est facile à déterminer, à l'aide de la méthode de la numération sur plaque. (Pour plus amples détails, voir ci-dessous.)

Exp. I. — 4,5 cent. cubes d'une culture de *Bifidus* en bouillon de quatre jours, dans laquelle se trouvait un résidu riche en bacilles, sont mêlés avec 4,5 cent. cubes de bouillon sucré et 0,00001 cent. cube d'une culture de *Bact.*

coli com., ou de *Bact. lact. aerogenes* en bouillon, datant de vingt-quatre heures et diluée dans 1 cent. cube d'une solution physiologique salée (I). Par un examen au microscope et l'établissement de cultures, nous nous sommes convaincu que, dans cette expérience comme dans toutes les suivantes, la culture de *Bifidus* était restée pure. A titre de contrôle, nous avons mêlé 9 cent. cubes d'un bouillon sucré avec 0,00001 cent. cube de *Bact. coli* ou de *Bact. lact. aerogenes*, également dilué dans 1 cent. cube de solution physiologique salée (II). Immédiatement après le mélange, nous avons prélevé 0,1 cent. cube sur les différents tubes à essai en vue de déterminer le nombre des bactéries ensemencées. Pour imiter autant que possible les conditions naturelles du canal intestinal, nous avons fait le vide dans les tubes à essai et nous les avons mis à 37 degrés centigrades. Après quarante-huit heures, de nouveaux échantillons furent prélevés. Résultat :

Tableau I.

	Bac. coli commune.		Bac. lactis aerogenes.	
	Immédiatement.	Après 48 heures.	Immédiatement.	Après 48 heures.
I.	23.594 (1)	136	1.516	8
II.	37.222	∞	1.084	∞

L'expérience fut faite de manière à tenir toujours en vie le *Bacillus bifidus*, et, en ajoutant du bouillon sucré frais, on lui a donné la possibilité de pousser ultérieurement.

Son action sur les bactéries ensemencées, comme le montre le tableau I, est frappante. Après quarante-huit heures, il ne reste plus en vie de *B. coli* et de *B. aerogenes*, qu'un tout petit nombre, tandis que dans les tubes témoins une quantité innombrable de ces microbes se sont développés. *Une culture de* Bifidus *en développement agit donc sur le* Bac. coli com. *et sur le* Bact. lact. aerog. *comme un liquide bactéricide énergique.*

Quelle peut être la cause de cette action bactéricide qui se manifeste *in vitro*? S'agit-il d'une concurrence entre le *B. bifidus* et les autres bactéries, en ce sens que le *Bifidus*, par suite de son énergie vitale plus intense, enlève aux autres microbes les principes qui servent à leur développement? S'il en est ainsi, on doit s'attendre à ce que l'empêchement de la pullulation du *Bifidus*, réalisé par la vie en présence de l'oxygène, supprime cette action bactéricide. Nous avons entrepris des expériences de ce genre et nous avons constaté qu'au contraire, dans ces conditions, cette action bactéricide persiste.

(1) Nombre de colonies apparues sur la plaque d'agar après vingt-quatre heures.

Exp. II. — I. — 3 cent. cubes d'une culture de *Bifidus* datant de 3 jours sont mêlés avec 3 cent. cubes de bouillon sucré, 0,00001 cent. cube d'une culture de *B. proteus vulgaris*, ou de *Staphylococcus aureus* datant de 24 heures et dilué dans 1 cent. cube de solution physiologique salée. Culture aérobie.

II. — Contrôle, 3 cent. cubes de solution physiologique salée + 3 cent. cubes de bouillon sucré + 0,00001 cent. cube de *prot.* ou de *Staphyl.* dans 1 cent. cube de solution physiologique salée.

Tableau II.

	Bac. proteus vulgaris.		Staphylococcus aureus.	
	Immédiatement.	Après 20 heures.	Immédiatement.	Après 20 heures.
I.	10.782	50	2.063	8
II.	4.262	∞	3.596	∞

Les microbes employés dans cette expérience, le *B. proteus vulgaris* et le *Staphylococcus aureus* avaient, comme le montrent les tubes de contrôle, suffisamment de substances alimentaires pour se développer. La même quantité de ces substances se trouvait dans les tubes où les bactéries avaient été mis ensemble avec le *Bac. bifidus*, néanmoins, non seulement ils ne se développèrent pas, mais ils succombèrent. Il ne peut donc pas s'agir d'une concurrence pour les substances alimentaires, mais l'expérience nous prouve plutôt que, *dans un liquide où s'est développé pendant quelque temps le* Bac. bifidus, *existent des produits ayant des propriétés bactéricides.*

Or, il y avait intérêt à analyser la nature et la provenance de ces substances bactéricides. Pour décider si elles se trouvent dans les corps des bacilles, nous avons fait l'expérience suivante.

Exp. III. — Une culture de *Bifidus* de 7 jours est énergiquement centrifugée. Le liquide est prélevé à l'aide d'une pipette et le résidu lavé à trois reprises dans une solution physiologique salée. Les bacilles lavés sont ensuite dilués dans une quantité de solution physiologique salée de même volume que la culture employée. L'émulsion de bacilles est traitée par la congélation et par un chauffage à 45 degrés centigrades, pratiqués alternativement à plusieurs reprises.

I. — 4 cent. cubes du liquide de centrifugation + 3 cent. cubes de bouillon sucré.

II. — 4 cent. cubes de l'extrait de bacilles + 3 cent. cubes de bouillon sucré.

III. — 4 cent. cubes de solution physiologique salée + 3 cent. cubes de bouillon sucré.

Tous les tubes furent additionnés de 0,00001 cent. cube de *B. coli*, ou de *B. lactis aerogenes* dans 1 cent. cube de solution salée.

Tableau III.

	Bac. coli commune		Bac. lactis aerogenes.	
	Immédiatement.	Après 20 heures.	Immédiatement.	Après 20 heures.
I.	110	36	232	0
II.	92	∞	396	∞
III.	85	∞	1.551	∞

Les bacilles *Bifidus* lavés, et dont on avait préparé l'extrait n'ont aucune action sur le développement du *B. coli* et du *B. lactis aerogenes*; ils poussent dans ce liquide aussi bien que dans un bouillon ordinaire. Le liquide de centrifugation, par contre, exerce un effet bactéricide énergique. L'expérience nous démontre donc *que les produits bactéricides d'une culture de* B. bifidus *sont dissous dans le liquide et non liés aux corps mêmes des bacilles.*

Les substances en question passent à travers un filtre Chamberland, ce qui ressort de l'expérience suivante :

Exp. IV. — Une culture de *Bifidus* de 5 jours est passée par un filtre Chamberland.

I. — 3,5 cent. cubes du filtrat + 3,5 cent. cubes de bouillon sucré.

II. — 3,5 cent. cubes de solution salée + 3,5 cent. cubes de bouillon sucré.

Chacun des tubes est additionné de 0.00001 cent. cube de *B. coli* ou de *B. lact. aerog.*, dans 1 cent. cube de solution physiologique salée.

Tableau IV.

	Bac. coli commune.		Bac. lactis aerogenes.	
	Immédiatement.	Après 20 heures.	Immédiatement.	Après 20 heures.
I.	432	1	26	0
II.	420	∞	29	∞

Les substances bactéricides du sérum sanguin et certaines substances des globules blancs se distinguent, on le sait, par leur thermolabilité. On serait donc porté à supposer que les substances bactéricides existant dans les cultures de *Bifidus* sont de nature semblable. Les deux expériences suivantes prouvent pourtant à l'évidence qu'il n'en est pas ainsi :

Exp. V. — I. — 3 cent. cubes d'une culture de *Bifidus* de 3 jours + 3 cent. cubes de bouillon sucré.

II. — 3 cent. cubes de culture de *Bifidus*, chauffée pendant une demi-heure à 75 degrés centigrades + 3 cent. cubes de bouillon sucré.

III. — 3 cent. cubes de culture de *Bifidus*, chauffée pendant une demi-heure à 100 degrés centigrades + 3 cent. cubes de bouillon sucré.

IV. — 3 cent. cubes de solution physiologique salée + 3 cent. cubes de bouillon sucré.

Tous les tubes sont additionnés de 0,00001 cent. cube de *B. coli* dans 1 cent. cube de solution physiologique salée.

Tableau V.

	Immédiatement.	Après 20 heures.
	—	—
I	464	362
II	620	308
III	652	236
IV	864	∞

Exp. VI. — Une culture de *Bifidus* de sept jours est passée par le filtre Chamberland.

I. — 3 cent. cubes de filtrat + 3 cent. cubes de bouillon sucré.

II. — 3 cent. cubes de filtrat, chauffé pendant une demi-heure à 75 degrés centigrades + 3 cent. cubes de bouillon sucré.

III. — 3 cent. cubes de filtrat, chauffé pendant une demi-heure à 100 degrés centigrades + 3 cent. cubes de bouillon sucré.

IV. — 3 cent. cubes de solution physiologique salée + 3 cent. cubes de bouillon sucré.

Tous les tubes sont additionnés de 0,00001 cent. cube de *B. lactis aerog.*, dans 1 cent. cube de solution physiologique salée.

Tableau VI.

	Immédiatement.	Après 20 heures.
	—	—
I	112	0
II	124	1
III	152	2
IV	150	∞

Les cultures de *Bifidus* chauffées pendant une demi-heure à 75 ou à 100 degrés centigrades exercent la même action bactéricide que la culture non chauffée (tabl. V). Il en est de même des filtrats Chamberland (tabl. VI).

Ces deux expériences nous démontrent donc *que les substances bactéricides renfermées dans une culture de* Bifidus, *sont thermostabiles.*

Pour déterminer plus exactement la nature des corps en question, nous les avons encore mis à l'épreuve pour voir comment ils se comportent au point de vue de la dialyse.

Exp. VII. — Un sac en collodion est rempli de 15 cent. cubes d'une culture de *Bifidus* datant de 3 jours, plongé dans 15 cent. cubes d'eau distillée stéri-

lisée et mis à la température de la chambre pendant 48 heures. Par des expériences de culture, nous avons vérifié que les liquides n'étaient pas infectés par d'autres microbes.

I. — 4 cent. cubes de culture de *Bifidus* + 3 cent. cubes de bouillon sucré.

II. — 4 cent. cubes de culture dialysée + 3 cent. cubes de bouillon sucré.

III. — 4 cent. cubes de dialysat + 3 cent. cubes de bouillon sucré.

IV. — 4 cent. cubes de solution physiologique salée + 3 cent. cubes de bouillon sucré.

Chacun des tubes est additionné de 0,00001 cent. cube de culture de *B. coli* ou de *B. lactis aerog.*, dans 1 cent. cube de solution physiologique salée.

Tableau VII.

	Bac. coli commune.		Bac. lactis aerogenes.	
	Immédiatement.	Après 18 heures.	Immédiatement	Après 18 heures.
I.	276	64	1.798	73
II.	288	102	1.931	136
III.	312	52	2,121	108
IV.	416	∞	1.588	∞

Les produits bactéricides, comme il ressort du tableau VII, ont passé à travers la membrane de collodion, mais ils restaient tout de même dans le sac en quantité suffisante pour provoquer le même effet bactéricide que le dialysat et la culture originale.

L'expérience nous permet par conséquent de tirer la conclusion *que la substance bactéricide n'est pas de nature colloïdale.*

Quand le *B. bifidus* s'est développé énergiquement dans un bouillon sucré, la réaction est fortement acide. Cette réaction, comme le montre Tissier, est produite par l'acide lactique et l'acide acétique formés par la décomposition du sucre. Aussi cet auteur est-il d'avis que ces acides constituent la cause de l'action bactéricide de la culture de *Bifidus. Si la culture est neutralisée, les bacilles coli et lactis aerogenes poussent librement*, comme le montre l'expérience suivante.

Exp. VIII. — Une culture de *Bifidus*, datant de 5 jours est passée au filtre Chamberland. Le filtrat est fortement acide.

I. — 3 cent. cubes de filtrat + 4 cent. cubes de bouillon sucré.

II. — 3 cent. cubes de filtrat neutralisé + 4 cent. cubes de bouillon sucré.

III. — 3 cent. cubes de filtrat, neutralisé et chauffé pendant une demi-heure à 75 degrés centigrades + 4 cent. cubes de bouillon sucré.

IV. — 3 cent. cubes de solution physiologique salée + 4 cent. cubes de bouillon sucré.

Tous les tubes sont additionnés de 0,00001 cent. cube de *B. coli* ou de *B. lactis aerog.*, dans 1 cent. cube de solution physiologique de chlorure de sodium.

TABLEAU VIII.

	Bac. coli commune.		Bac. lactis aerogenes.	
	Immédiatement.	Après 20 heures.	Immédiatement.	Après 20 heures.
I.	632	0	112	0
II.	364	∞	102	∞
III.	356	∞	94	∞
IV.	880	∞	150	∞

On pouvait penser qu'à côté des acides comme facteurs bactéricides, il existait, dans une culture de *Bifidus*, aussi d'autres substances bactéricides, dont la présence ne pourrait être constatée qu'après la neutralisation. L'expérience nous montre qu'il n'en est pas ainsi. Le filtrat de culture neutralisé reste complètement inactif.

Nos expériences ont donc prouvé que les cultures de *B. bifidus* exercent une action bactéricide énergique sur un certain nombre de micro-organismes, tels que *B. coli com.*, *lactis aerogenes*, *proteus vulgaris* et *Staphylococcus aureus*, et que, selon toute vraisemblance, ce sont les produits acides, formés par l'action du *Bifidus* sur le sucre, qui causent la disparition des bactéries. Nous n'avons pas réussi à constater dans une culture de *Bifidus* la présence de substances bactéricides thermolabiles de nature colloïdale, analogues à celles trouvées par Eijkmann, Conradi et Kurpjuweit, Moro et Murath dans des cultures de bactéries et dans des fèces.

Nous avons mentionné que Moro et Murath n'ont pu constater d'action bactéricide chez le *B. bifidus*. Ils examinaient si dans le résidu d'une culture de *Bifidus* en bouillon il existait des substances ayant des propriétés de cette nature. Leur expérience donnant un résultat négatif, ils tirèrent la conclusion que ce microbe ne produit pas de substances empêchantes. Or, que l'extrait de *B. bifidus* n'exerce pas d'action bactéricide, notre expérience III l'a montré. Les expériences de Moro et de Murath ne se trouvent donc pas en contradiction avec les nôtres. Mais dans leurs conclusions ces auteurs n'ont pas tenu compte des produits du développement du *Bacillus bifidus* qui sont susceptibles d'empêcher le développement des bactéries.

Le *Bacillus bifidus* exerce-t-il aussi dans l'intestin cette action

bactéricide que nous avons pu constater *in vitro*? Selon toute vraisemblance, oui. Nous savons que les fèces de l'enfant au sein, bien portant, ont une réaction acide. Chez l'enfant élevé avec du lait de vache, au contraire, nous trouvons assez fréquemment des fèces alcalines. Le sucre introduit avec la nourriture n'est pas complètement résorbé dans l'estomac et l'intestin grêle; il en existe dans le gros intestin des restes qui sont attaqués et décomposés par le *Bacillus bifidus*. La réaction acide des fèces de l'enfant au sein est, selon toute vraisemblance, le résultat de ce processus chimique. Si cette hypothèse est juste, il en résulte que le *Bacillus bifidus* joue un rôle important contre la pullulation dans l'intestin des micro-organismes étrangers pathogènes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Metchnikoff, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1894, p. 529.
2. Bienstock, *Ibidem*, 1899.
3. Tissier, *Recherches sur la flore intestinale des nourrissons*. Paris, 1900.
4. Eijkmann, *Centr. f. Bakt.*, 1904. Orig., p. 436.
5. Conradi et Kurpjuweit. *München. med. Wochenschr.*, 1905, p. 1761.
6. Moro et Murath, *Wien. klin. Wochenschr.*, 1906, p. 371.
7. Rolly, *Deutsch. med. Wochenschr.*, 1906, p. 1733.

SUR UN FERMENT CONTENU DANS LES EAUX
AGENT DE DÉSHYDRATATION DE LA GLYCÉRINE

par E. VOISENET.

Au cours de mon étude sur un ferment végétant dans les vins amers (1), transformant la *glycérine* en *acroléine*, et que pour cette double raison d'origine et de fonction physiologique,

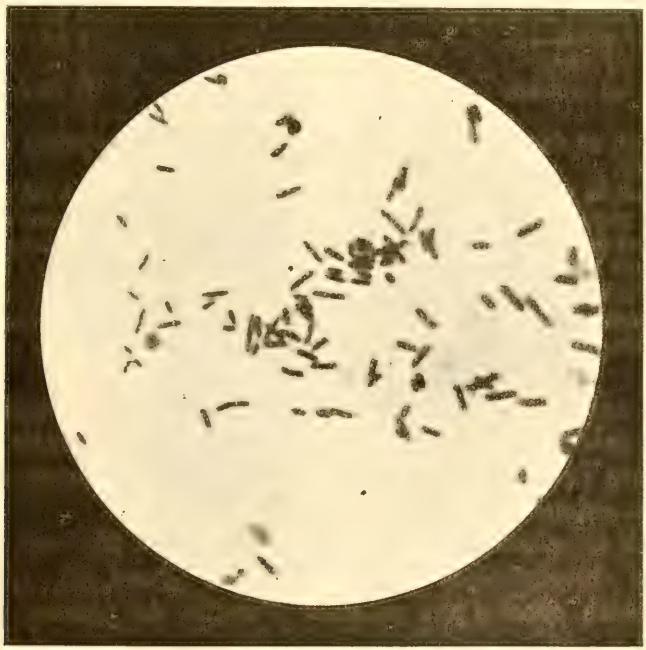


Fig. 1. — *B. amaracrylus*. (Gr. : 1/187[illegible]).

j'ai dénommé *Bacillus amaracrylus* (fig. 1), j'ai reconnu qu'en en semençant avec de l'eau de Dijon, un milieu minéral glycériné,

1) *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CLIII, 1911, p. 363, et t. CLVI, 1913, p. 1481.

peptoné ou non, il se produisait des cultures abondantes d'un bacille présentant les caractères morphologiques de celui que je venais d'isoler des vins amers, et capable, lui aussi, de déshydrater la glycérine.

J'ai appliqué cet essai à des eaux d'origines très diverses : toutes ont confirmé ce résultat. Cette propriété paraît donc générale pour les eaux.

En fait, voici dans sa simplicité, l'expérience qui montre cette déshydratation par voie biologique.

Le milieu liquide de composition suivante :

Sulfate d'ammoniaque	4 gr. 70
Phosphate de potasse	0 gr. 75
Sulfate de magnésie	0 gr. 10
Peptone	10 gr. »
Glycérine	10 gr. »
Eau ordinaire	Un litre,

est placé, en flacon plein et bouché, à l'étuve à la température de 25 à 30 degrés.

Au bout de vingt-quatre heures, le liquide est trouble : s'il a été préparé avec le phosphate bipotassique, sa réaction primitivement alcaline au tournesol, est devenue acide; préparé avec le phosphate monopotassique dont je me suis habituellement servi, sa réaction acide s'est accentuée : il est le siège d'une effervescence constituée par un mélange des gaz hydrogène et acide carbonique; l'hydrogène se dégageant à ce moment en proportion dominante, le gaz carbonique restant dissous en majeure partie.

Dès après cette période, tout à fait initiale, le réactif *protéique acide*, agissant *directement* sur le liquide, révèle généralement l'existence de l'acroléine. Ce réactif est composé des deux solutions suivantes :

Acide chlorhydrique nitreux. — On ajoute à 200 cent. cubes d'acide chlorhydrique pur et concentré ($d=1,18$), 1/10 de centimètre cube d'une solution d'azotite de potasse pur à 3 gr. 6 p. 100.

Eau albumineuse. — A un blanc d'œuf, on ajoute 5 à 7 cent. cubes d'eau distillée et l'on bat énergiquement ; on filtre sur une toile en exprimant : on obtient ainsi une solution d'albumine à 10 p. 100 environ.

Pour reconnaître l'acroléine dans le liquide de fermentation, il suffit de mesurer successivement dans une petite éprouvette graduée, 4 cent. cubes de liquide, 1 cent. cube d'eau albumineuse, puis 15 cent. cubes d'acide

chlorhydrique nitreux; après agitation pour redissoudre l'albumine coagulée, le mélange est versé dans un tube à essai pour être placé au bain-marie à 50 degrés : en quelques minutes, il se développe une coloration d'abord *verte*, conservant cette teinte, si la richesse du liquide en acroléine est égale ou supérieure à 1/5.000, et devenant *bleue* ensuite, si la richesse est inférieure à cette proportion.

Quelquefois, l'apparition de l'acroléine est plus rapide ou plus tardive; mais, dans la grande majorité de mes nombreux essais, le réactif l'a toujours décelée au bout de vingt-quatre à quarante-huit heures. Elle se forme aussi à température plus basse, 20, 18 ou 15 degrés; mais au bout d'un temps plus long, elle apparaît également à la température de 35 degrés, mais se transforme rapidement en sorte que sa formation peut passer inaperçue. Elle naît en milieu fortement magnésien, ou moins peptoné, ou purement minéral et sa production dans le vase à fermentation est toujours précédée de celle d'une autre aldéhyde, ainsi que je l'explique dans ce qui suit.

La présence de l'acroléine étant reconnue, le liquide, rectifié à l'aide d'un tube à distillation fractionnée, donne un premier fractionnement irritant pour les muqueuses nasale et surtout lacrymale exposées au voisinage de l'extrémité du réfrigérant. En raison de la facile volatilisation de l'aldéhyde acrylique, son odeur caractéristique si pénétrante se manifeste déjà avant l'entrée en ébullition du liquide et par suite avant l'écoulement dans le tube du réfrigérant des premières portions condensées. En opérant avec des liquides de fermentation donnant *directement* par le réactif *protéique acide* une teinte *verte* accusée et ne virant pas au bleu, indice d'une teneur maxima en acroléine, l'odeur à ce début de la distillation est intolérable; le larmoiement est intense, même lorsque l'expérience ne porte que sur un litre de culture : avec de tels liquides, l'action irritante se manifeste déjà dans les vapeurs dégagées par un volume même restreint porté à l'ébullition.

En prenant toutes les précautions requises en pareil cas pour condenser un produit aussi volatil et aussi altérable, on peut recueillir l'acroléine dans un volume réduit de distillatum, et la reconnaître à l'aide de ses autres réactions que j'ai déjà rappelées (1).

(1) *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CL, 1910, p. 1614; t. CLI, 1910, p. 518.

A part cette réaction fournie par le réactif *protéique acide*, et dont j'ai fait antérieurement l'étude (1), aucune de celles habituellement employées pour caractériser l'aldéhyde acrylique ne m'a permis d'en faire nettement la reconnaissance directe sur le liquide de fermentation, sans concentration préalable par distillation. Cet insuccès tient au manque de sensibilité pour les unes et de spécificité pour les autres ; ce dernier défaut étant commun en particulier au bisulfite de rosaniline et au nitrate d'argent ammoniacal : c'est ainsi que le liquide fermenté recolore bien le réactif de Schiff, parfois même énergiquement, mais cette coloration ne peut qu'annoncer la présence de la fonction aldéhyde sans attribution nominale.

Au contraire, le réactif *protéique acide*, très sensible pour l'acroléine, donne en outre avec elle une réaction distincte de celles fournies par les nombreuses aldéhydes saturées, ou comme elle, non saturées, que j'ai soumises à son action : en particulier, cette distinction existe même à l'égard de son homologue supérieure, l'aldéhyde crotonique, laquelle ne donne pas la coloration bleue fournie par l'acroléine.

Toutefois, il convient de remarquer, surtout pour l'étude actuelle, que l'aldéhyde hydracrylique en solution de titre supérieur à 1/1.000, donne une réaction colorée verte analogue, vraisemblablement par suite de sa transformation partielle en acroléine par déshydratation sous l'influence de l'acide chlorhydrique et de la température. En solution plus diluée, cette aldéhyde fournit sa réaction colorée propre qui est rose ; pour certaines concentrations voisines du titre limite précédent on obtient une coloration mixte parfois dichroïque, rose à reflets verdâtres : dans les mêmes conditions, l'acroléine, même à dose infinitésimale, donne une belle couleur bleue.

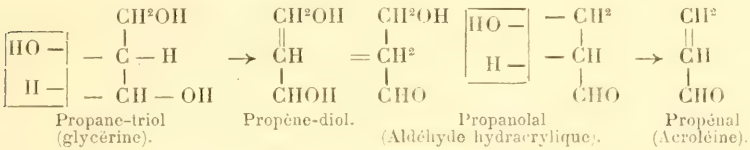
Ainsi, et indépendamment d'autres propriétés, notamment de l'odeur bien moins irritante de l'aldéhyde hydracrilique et de son point d'ébullition beaucoup plus élevé, situé à 90 degrés sous la pression de 18 millimètres, tandis que l'acroléine bout à 52 degrés sous la pression ordinaire, le réactif *protéique acide* permet encore, avec des dilutions convenables, de faire la

(1) Sur une nouvelle réaction colorée de l'acroléine. *Journal de Pharmacie e de Chimie*, t. II, 1910, p. 214.

distinction entre ces deux aldéhydes dont chacune est capable d'engendrer l'autre par les processus inverses d'hydratation et de déshydratation.

Ces propriétés attestent la supériorité évidente de ce réactif pour la reconnaissance de l'aldéhyde acrylique en général, et font que la fermentation précédente, par la facilité de sa démonstration, peut devenir l'objet d'une expérience très intéressante dans un cours ou une séance de travaux pratiques de chimie biologique.

Bien plus, ce réactif permet de reconnaître les deux phases de la déshydratation de la glycérine. On admet en effet, et on enseigne sans le démontrer expérimentalement, que l'action des agents de déshydratation sur ce tri-alcool est comparable à celle qu'ils exercent sur les glycols : une première soustraction d'eau et une isomérisation conduisant au *propanolal* 1-3, aldéhyde saturée; puis, l'action comportant une phase de plus, par suite de la présence d'une troisième fonction alcool, une deuxième soustraction d'eau transforme le *propanolal* en *acroléine*, aldéhyde non saturée :



En suivant la fermentation à l'aide de notre réactif de coloration des aldéhydes, on reconnaît la succession de deux phases aboutissant à la production d'aldéhydes distinctes. En essayant le liquide avant qu'il puisse donner la coloration vert bleuâtre, due à l'acroléine, par exemple quinze à vingt heures après la mise à l'étuve, on obtient une coloration rose qui est due à une aldéhyde, car le liquide recolore aussi le réactif de Schiff : sa production à partir de la glycérine, sa transformation successive en acroléine, sa réaction colorée permettent d'identifier cette aldéhyde avec le *propanolal* 1-3 ou aldéhyde *hydracrylique*.

La même coloration se reproduit d'ailleurs à la fin de la fermentation quand celle-ci devient languissante ; mais la cause en est différente et tient alors à l'incapacité du ferment, paralysé par les acides, de pouvoir réaliser la seconde phase, et la meil-

leure preuve en est qu'il suffit à ce moment d'ajouter du carbonate de chaux pour voir reparaître l'acroléine quelques heures après, surtout s'il reste encore suffisamment de glycérine à transformer.

C'est encore à la production de ces deux aldéhydes, qu'est due la succession de colorations observées au cours de la fermentation dans l'action du réactif, sur une même prise d'essai du liquide donnant faiblement l'odeur de l'acroléine à la distillation ; coloration d'abord rose, puis violacée, devenant finalement bleue.

Au bout de deux jours environ, la quantité d'acroléine peut atteindre 0 gr. 20 par litre, dose maxima compatible avec la vitalité du ferment dans le milieu acide qu'il s'est créé : mais l'aldéhyde acrylique, comme le propanolal dont elle dérive, se transforme sans cesse dans le vase à fermentation et ses métamorphoses sont d'origine chimique et biochimique. Dans ce procès fermentatif de la glycérine, comme dans celui qu'elle subit sous l'action du ferment des vins amers, l'évolution de cette substance et de ses produits successifs de déshydratation, *propanolal* et *acroléine* est subordonnée à divers facteurs, tels que : température, valeur nutritive et réaction du milieu, qualité et quantité du ferment, vie aérobie ou anaérobie, réactions chimiques secondaires, etc.

Lorsque toutes ces conditions s'accordent pour conférer au ferment l'*activité déshydratante maxima*, la première aldéhyde ne subsiste pas dans le liquide, et, à part ses autres métamorphoses, elle est transformée dans la seconde presque au fur et à mesure de sa production : il en résulte un changement souvent subit dans l'allure de la réaction ; ainsi, dans plusieurs de mes expériences, j'ai obtenu avec la même culture, par deux examens successifs, à trois heures seulement d'intervalle, passage du rose au vert : c'est alors que le réactif *protéique acide* donne la coloration verte intense et ne virant pas au bleu qui est le témoin de la richesse du liquide en acroléine et de l'instant propice pour son extraction ; c'est également à cette période que la distillation révèle au plus haut degré l'odeur intolérable de cette aldéhyde.

Au contraire, lorsque le ferment se présente à la glycérine avec une *activité déshydratante minima* ainsi qu'il arrive au

début et à la fin de la fermentation, mais pour des causes différentes, l'aldéhyde hydracrylique, soit qu'elle demeure dans le liquide, soit qu'elle se transforme, notamment par hydrogénation, y domine néanmoins par rapport à l'acroléine, dont la présence est cependant révélée par la nuance bleue finale de la réaction et l'épreuve organoleptique à la distillation.

Exceptionnellement, le réactif donne uniquement, même au milieu de l'opération, une teinte rose violacé due à la première aldéhyde : dans ce cas, ou bien le ferment est impuissant à réaliser la seconde phase de la déshydratation, ou plutôt la formation de l'acroléine est trop réduite, ses métamorphoses sont trop rapides, pour qu'elle puisse être nettement reconnue.

La coloration rose ne peut être attribuée à la peptone ou à l'un de ses dérivés, car, d'une part, le même liquide de culture non glycériné ne la reproduit pas dans des conditions comparables ; d'autre part, elle se manifeste avec une culture glycérinée purement minérale.

Il importe également de ne pas la confondre avec la réaction colorée analogue que peut produire l'HCl nitreux agissant seul sur l'albumine dans certaines conditions que j'ai précisées (1) : cette dernière diffère de celle que donne le réactif acide sur la matière protéique en présence d'une aldéhyde, à la fois par le temps nécessaire à sa production, qui est beaucoup plus long; par l'intensité de la coloration, qui reste toujours faible et par la nature même de cette coloration dans les solutions faibles d'albumine : en particulier, pour cette distinction, il convient, dans les essais comparatifs, de diminuer la dose d'albumine, jusqu'à ce que l'épreuve à blanc des réactifs ne donne qu'une légère coloration orangée.

En rectifiant les liquides de culture qui donnent, avec le réactif *protéique acide*, la coloration verte, signe de la richesse maxima en acroléine, j'ai pu isoler une quantité suffisante de cette aldéhyde pour la caractériser par sa transformation en acide acrylique et sous forme de son sel d'argent.

Chaque culture, du volume de 5 litres, est soumise à la distillation et le premier réactionnement est rectifié une seconde fois sur de l'oxyde de

(1) Sur une réaction colorée des albuminoïdes, *Bulletin de la Société Chimique*, t. XXXIII, 1905, p. 1200.

plomb, pour fixer les traces d'acides volatils : ce dernier distillatum, du volume de 100 cent. cubes environ, est aussitôt mis en rapport avec de l'oxyde d'argent récemment précipité et bien lavé ; on abandonne pendant deux jours à la température ordinaire et dans l'obscurité, en agitant fréquemment : au bout de ce temps, l'odeur acrylique a disparu; on porte à l'ébullition et on filtre.

L'ensemble des liqueurs ainsi obtenues, du volume de 1 litre environ, et provenant de 50 litres de culture, est additionné de carbonate de soude jusqu'à réaction faiblement alcaline : on filtre, on évapore à sec et on traite le résidu par de l'acide sulfurique dilué de son volume d'eau; on filtre à nouveau, et la liqueur est soumise à la distillation. Le distillatum saturé à chaud par de l'oxyde d'argent, filtré, laisse déposer par refroidissement dans l'obscurité, des cristaux prismatiques à éclat velouté, brunissant lentement à la lumière. Ce fractionnement cristallin, recueilli et complètement séché à 95 degrés, dans une étuve à air, pèse 1 gr. 28. Soumis à l'analyse, 0 gr. 5778 ont donné : 0 gr. 4204 CO^2 ; 0 gr. 0904 H^2O ; 0 gr. 3498 Ag ; nombres qui permettent d'établir les compositions centésimales suivantes :

	TROUVÉ	CALCULÉ POUR $C^3H^3O^2.Ag$
C.	19,85	20,11
H.	1,74	1,68
O.	»	17,88
Ag	60,54	60,33
		100,00

résultats qui concordent avec la composition de l'acrylate d'argent.

Il est à remarquer que, dans cette opération, la présence d'aldéhyde hydracrylique ne nuirait pas à l'exactitude de l'analyse, l'acide résultant de son oxydation étant décomposé par l'acide sulfurique en eau et acide acrylique.

En déposant sur une lame une goutte de la culture et la colorant légèrement avec du bleu de méthylène boracique, l'examen microscopique révèle la présence de nombreux bacilles en forme de bâtonnets.

Le ferment a été purifié par ensemencements successifs dans le même milieu, puis isolé par des cultures sur plaques de gélatine. Les colonies sont tardives, minuscules, arrondies, blanchâtres, non liquéfiantes. Une trace d'une colonie ensemencée dans le milieu précédent, maintenu à la température de 30 degrés, m'a donné une culture d'un bacille présentant les caractères suivants (fig. 2) :

Petits bâtonnets, mesurant 0,8 μ de largeur, sur 2 μ à 4 μ de longueur, généralement séparés, quelquefois soudés bout à bout, en ligne droite, courbe ou sinueuse, formant dans les cultures anciennes des filaments plus ou

moins longs ; bacille très mobile, prenant le Gram, anaérobie facultatif, sporifère, résistant à la dessiccation et à une chaleur sèche de 100 degrés ; ne donnant pas d'indol dans les milieux peptonés, mais un peu d'ammoniaque ; transformant en nitrite le nitrate de potasse, coagulant le lait ; très facile à cultiver, avec température optima de développement comprise entre 30 et 35 degrés ; végétant dans le bouillon peptoné phéniqué à 1 p. 1.000, à la température de 42 degrés ; il s'accommode de liquides nutritifs minéraux dans lesquels on dissout la matière fermentescible.

Il fait fermenter les sucres et divers alcools polyatomiques, notamment la

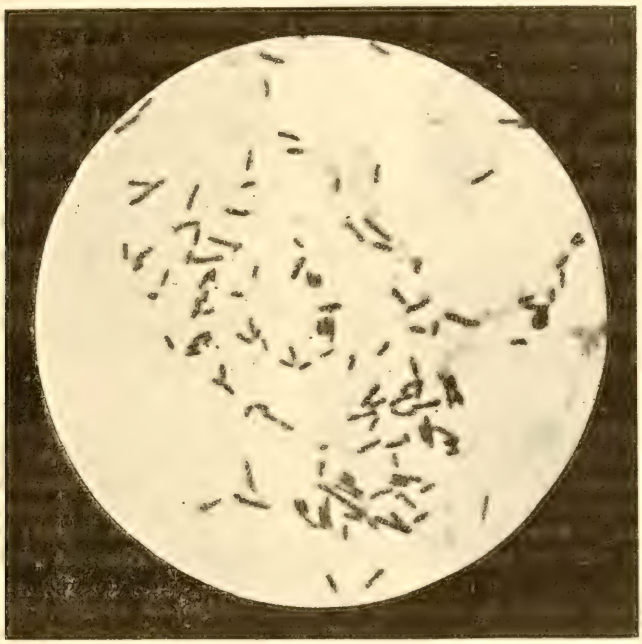


Fig. 2. — Bacille des eaux. (Gr. : 1875/1.)

glycérine et la mannite ; il n'agit que modérément sur la dextrine et reste inactif vis-à-vis de l'amidon.

A part l'aldéhyde hydracrylique et l'acroléine, ainsi que leurs dérivés par hydrogénation, comme le glycol triméthylénique ; par polymérisation, acétalisation, résinification ou décomposition par l'eau, qu'il fournit avec la glycérine, les produits de ces fermentations sont les suivants : mélange gazeux constitué par de l'hydrogène en proportion dominante et de l'acide carbonique, alcool éthylique ; acides formique, acétique, une petite quantité d'acide volatil insoluble, et les acides lactique et succinique.

Tous les faits précédents ont été reproduits et contrôlés avec

l'espèce pure, cultivée en milieu glycériné peptoné ou purement minéral.

Il est à remarquer que cette fermentation de la glycérine donne lieu à la formation d'une quantité appréciable de glycol triméthylénique.

J'ai reconnu cette production en étudiant l'action en milieu minéral additionné de carbonate de chaux et en recherchant si la transformation était complète ; en utilisant les méthodes d'extraction usitées en pareil cas, j'ai obtenu invariablement un résidu sirupeux à saveur chaude et légèrement sucrée, que j'ai pris tout d'abord pour de la glycérine, mais qui n'en contient pas trace, si la fermentation a été suffisamment prolongée et en prenant soin de protéger le bacille contre l'acidité du milieu en remettant en suspension le carbonate de chaux par l'agitation journalière du liquide ; ce résidu chauffé avec du bisulfate de potasse ne donne, en effet, aucun dégagement d'acroléine.

Pour l'étudier, je l'ai produit en plus grande quantité en soumettant à la fermentation 300 grammes de glycérine en milieu purement minéral.

Le liquide minéral de Laurent, additionné de 30 grammes de glycérine par litre, est réparti dans des flacons à l'émeri de 1 litre, dans chacun desquels on a introduit 20 grammes de carbonate de chaux; après stérilisation et refroidissement, on ensemence avec l'espèce pure, et les flacons, pleins et munis de leurs bouchons, sont placés à l'étuve à 30 degrés; on agite matin et soir; au bout de trois semaines, la fermentation est terminée et complète.

Le liquide séparé du carbonate de chaux résiduel est soumis à la distillation jusqu'à réduction au cinquième ; on précipite exactement la chaux par l'acide oxalique que l'on ajoute ensuite en léger excès pour libérer les acides de leurs combinaisons alcalines; on filtre, et le liquide est évaporé au bain-marie jusqu'à réduction au dixième, puis finalement dans le vide ; il se forme un abondant dépôt de sulfate d'ammoniaque ; on reprend par l'alcool absolu qui insolubilise complètement ce sel, on filtre, et on évapore à nouveau au bain-marie d'abord, puis dans le vide pour achever de séparer l'alcool. On obtient ainsi un liquide sirupeux que l'on triture avec du sable et que l'on épuise par l'éther concentré pour enlever les acides fixes; le résidu incorporé au sable est ensuite dissous par l'alcool et la solution évaporée comme précédemment abandonne un produit sirupeux très épais, légèrement coloré en brun qui est constitué presque uniquement par du glycol triméthylénique, mélangé à une petite quantité d'une matière azotée d'excrétion du bacille.

En soumettant ce produit à la distillation fractionnée, il se dégage d'abord à 78 degrés des traces d'alcool, ensuite, et jusque vers la température de 150 degrés, une notable quantité de vapeurs à odeur et à réaction ammo-

niacales ; puis le thermomètre monte rapidement et se fixe à 214 degrés, température à laquelle il distille un produit incolore, sirupeux, très épais, à odeur légèrement empyreumatique, à saveur chaude et légèrement sucrée.

Ce liquide ne renferme pas trace de glycérine et présente les caractères d'un alcool ; exposé longuement à l'air, il s'oxyde lentement en donnant une aldéhyde reconnaissable par le réactif de Schiff; l'oxydation par l'eau oxygénée en liqueur très diluée et en présence de sulfate ferreux, suivie de l'élimination du fer et de l'acide sulfurique par l'eau de baryte, donne immédiatement et avec plus d'intensité le même résultat : de plus, l'aldéhyde ainsi engendrée fournit avec le réactif *protéique acide* les caractères de coloration de l'aldéhyde hydracrylique : tous résultats qui, à eux seuls, suffiraient presque à caractériser le propylglycol normal.

Soumis à une deuxième rectification, puis à l'analyse élémentaire, 0 gr. 3520 de ce produit ont donné : 0 gr. 6115 CO^2; 0 gr. 3396 H^2O; d'où les compositions centésimales :

	TROUVÉ	CALCULÉ POUR $C^3H^8O^2$
C.	47,40	47,37
H.	10,71	10,52
O.	»	42,11
		100,00

résultats qui concordent avec la composition d'un propylglycol.

Cette production de glycol triméthylénique que j'avais déjà observée dans l'étude du *Bacillus amaracrylus* est intéressante, car elle peut servir d'appui à la formation de l'aldéhyde hydracrylique jusqu'ici simplement révélée par une réaction colorée et par sa qualité de corps aldéhydique dérivé de la glycérine et transformable en acroléine.

Ce propanolal, corps de transition entre la glycérine et l'acroléine, autre dérivé dont la présence a été dûment constatée, ne jouerait-il pas le même rôle entre la glycérine et le propylglycol dont il est précisément l'aldéhyde et dont l'analyse du liquide révèle également l'existence ?

Sachant que cette fermentation de la glycérine est accompagnée d'une production abondante d'hydrogène, résultant de sa transformation analytique en alcool, en acides formique, acétique, lactique, ou même synthétique sous forme d'acide

succinique, cette hypothèse fondée sur la génération classique d'un alcool par hydrogénation de son aldéhyde prend l'apparence d'une très grande vraisemblance.

En résumé, cette idée étant admise, deux actions principales traduiraient, au moins en partie, cette fermentation de la glycérine :

1° *Une déshydratation* avec production d'aldéhyde hydracrylique, déshydratation complétée par une transformation partielle de ce corps en acroléine : cette action primordiale étant subordonnée à la présence d'un être vivant.

2° *Une hydrogénation*, transformant une autre partie de l'aldéhyde hydracrylique en son alcool, le glycol triméthylénique ; cette action secondaire étant purement chimique.

L'aldéhyde hydracrylique deviendrait alors en quelque sorte le pivot de cette transformation et figurerait, même en priorité sur l'acroléine, dans la catégorie de ces corps transitoires dont la présence momentanée dans le vase à fermentation est beaucoup plus utile à reconnaître que celle des termes ultimes et définitifs, parce qu'ils traduisent le mode de fonctionnement de la cellule ferment.

Tous ces faits de l'expérience et de déduction m'ont conduit à cultiver le ferment en milieu nutritif seul ou en présence de substances sur lesquelles il agit, glycérine, mannite, sucres, chacun de ces milieux étant additionné d'aldéhyde hydracrylique par petites doses et graduellement espacées. La quantité maxima de cette aldéhyde tolérée par le ferment est relativement beaucoup plus grande que pour l'acroléine : l'aldéhyde hydracrylique subit une transformation assez rapide ; mais ces expériences ne sont encore qu'à leur début.

En résumé, par ses caractères morphologiques, par ses propriétés biochimiques, au moins qualitatives, ce ferment retiré des eaux, apparaît comme identique au *Bacillus amaracrylus*, isolé des vins amers. Il reste à savoir si cette ressemblance s'affirme encore par l'analyse quantitative des produits formés et si, enfin, ce ferment ensemencé dans un vin de composition favorable à son développement, peut lui communiquer la maladie de l'amertume : c'est là le but de recherches actuellement en cours

ÉTUDES SUR LA RICINE

RECHERCHE DE LA RICINE (TOXINE ET AGGLUTININE) DANS LES DIFFÉRENTES ESPÈCES ET VARIÉTÉS DE RICIN

par Henri AGULHON.

Stillmark a signalé la présence de la ricine (toxine agglutinine) dans 10 espèces différentes de ricin (1). Il nous a paru intéressant de reprendre et d'étendre cette recherche. En effet, il est important de savoir, au point de vue théorique, si la présence de ricine est une propriété spécifique des graines du genre *Ridinus*, un caractère définissant ce genre, comme la présence de certains alcaloïdes définit certaines espèces végétales. D'autre part, la teneur en toxine et agglutinine est-elle constante ou variable suivant les différentes espèces et variétés pour un même poids de graine? Cette dernière question n'a pas été abordée par Stillmark.

Nous avons pu nous procurer 21 espèces ou variétés de graines dont on trouvera l'énumération dans le tableau ci-joint. La longueur des graines variait de 10 millimètres (*R. africanus*) à 22 millimètres (*R. zanzibariensis enormis*).

Dix grammes de graines de chaque espèce étaient broyées au mortier avec 20 cent. cubes d'eau physiologique. Après un quart d'heure de contact, on filtrait sur filtre mouillé. Dans ces conditions on obtenait un liquide clair sur lequel nous recherchions, d'une part la toxine, d'autre part l'agglutinine ; 1 cent. cube de nos solutions correspondait donc à 0 gr. 5 de graine (50 p. 100).

(1) Ueber Ricin, *Arbeit. des pharm. Inst. Dorpat*, t. III, p. 145, 1889 (M. Ailaire avait déjà reconnu l'existence de toxine spécifique dans certains des échantillons que nous avons étudiés. — Recherches inédites).

Recherche et titrage de la toxine.

L'animal d'expérience était le cobaye de 400 à 450 grammes. Les injections étaient faites sous la peau du ventre. Des dilutions successives dans l'eau physiologique de la liqueur primitive nous permettaient d'en injecter 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10.000 de cent. cube sous le volume constant de 1 cent. cube.

Le tableau ci-contre donne les résultats obtenus avec les différentes espèces et variétés de ricin. On y note le temps au bout duquel l'animal injecté meurt. Pour les animaux vivants encore après une semaine, nous indiquons la grandeur de l'eschare, en appelant « eschare étendue » une eschare de diamètre supérieur à 3 centimètres, « petite eschare » une eschare de diamètre inférieur à 1 centimètre, et simplement « eschare » tout type intermédiaire entre les deux extrêmes.

On voit que, pour la dose de 1/100 de cent. cube, l'extrait aqueux à 50 p. 100 des graines de toutes les espèces et variétés de ricin étudiées tue le cobaye de 400 à 450 grammes en 1 jour 1/2 à 2 jours. Pour les doses inférieures les variétés de résistance individuelle rendent la concordance des résultats moins nette, mais ces résultats sont cependant du même ordre. Dans tous les cas, les réactions observées étaient bien les réactions caractéristiques de l'intoxication ricinique, comme l'ont montré l'étude anatomo-clinique et l'influence neutralisante du sérum spécifique préparé par M. Truche. On peut donc dire :

1° *Que les* 21 *espèces et variétés de ricin étudiés renferment de la ricine* (1) ;

2° *Que pour un même poids de graine, la quantité de toxine, mesurée par ses effets, est sensiblement identique dans tous les cas.*

La présence de ricine apparaît donc bien comme un caractère fixe du genre *Ricinus*.

(1) Quatre des espèces étudiées par Stillmark ne figurent pas dans celles que nous avons pu nous procurer : *R. guyanensis nanus*, *R. altissimus*, *R. brasiliensis* et *R. jamaïcensis*. Cela fait donc en tout 25 espèces ou variétés dans lesquelles la présence indubitable de toxine a été démontrée jusqu'ici.

	DOSE INJECTÉE EN FRACTIONS DE CENTIMÈTRE CUBE DE SOLUTION PRIMITIVE :			
	1/10	1/100	1/1.000	1/10.000
Ricinus communis major	Mort en moins de 1 j.	Mort en 1 j. 1/2.	Escarre.	Escarre.
R. communis minor	Mort en moins de 1 j.	Mort en 1 j. 1/2.	Mort en 4 jours.	Petite escarre.
R. africanus	Mort en 1 jour.	Mort en 1 j. 1/2.	Mort en 7 jours.	Escarre.
R. cambodgiensis	Mort en 1 jour.	Mort en 1 j. 1/2.	Mort en 3 j. 1/2.	Petite escarre.
R. sanguineus	Mort en 1 jour.	Mort en 1 j. 1/2.	Mort en 7 jours.	Petite escarre.
R. tricolor	Mort en 1 jour.	Mort en 1 j. 1/2.	Escarre étendue.	Mort en 7 jours.
R. spectabilis	. . . . .	Mort en 1 j. 1/2.	Mort en 4 jours.	Escarre.
R. purpureus	. . . . .	Mort en 1 j. 1/2.	Escarre étendue.	Escarre.
R. hybridus panormitanus	. . . . .	Mort en 1 j. 1/2.	Mort en 5 jours.	Escarre.
R. borboniensis arboreus	. . . . .	Mort en 1 j. 1/2.	Mort en 7 jours.	Escarre.
R. macrophyllus purpureus	. . . . .	Mort en 1 j. 1/2.	Mort en 2 jours.	Petite escarre.
R. zanzibariensis	Mort en 1 j. 1/2.	Mort en moins de 2 j.	Mort en 3 j. 1/2.	Escarre.
R. — picturatus	. . . . .	Mort en 1 j. 1/2.	Escarre.	Escarre
R. — cinerascens	. . . . .	Mort en 2 jours.	Escarre étendue.	Escarre.
R. — maculatus	. . . . .	Mort en 2 jours.	Escarre étendue.	Escarre étendue.
R. — niger	. . . . .	Mort en 1 j. 1/2.	Escarre.	Petite escarre.
R. — enormis	. . . . .	Mort en 2 jours.	Escarre.	Petite escarre.
R. gibsoni	. . . . .	Mort en 1 j. 1/2.	Mort en 5 jours.	Escarre étendue.
R. gibsoni coccineus	. . . . .	Mort en 2 jours.	Escarre.	Petite escarre.
R. gibsoni mirabilis	. . . . .	Mort en 1 j. 1/2.	Escarre.	Petite escarre.
R. philippiniensis purpureus	. . . . .	Mort en 1 j. 1/2.	Escarre.	Mort en 3 j. 1/2.

Recherche et titrage de l'agglutinine.

Nous avons recherché et titré comparativement la propriété agglutinante de l'extrait aqueux des différentes graines sur les hématies de lapin lavées à l'eau physiologique. De petits tubes, contenant chacun 1 cent. cube d'une émulsion à 5 p. 100 de ces hématies dans l'eau physiologique, recevaient, sous le volume de 1 cent. cube, des dilutions de l'extrait aqueux des graines correspondant respectivement à 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 de cent. cube du liquide primitif. On abandonnait pendant 24 heures à la température ordinaire. Avec toutes les graines examinées les résultats observés pour les différentes dilutions ont été sensiblement les mêmes, à savoir :

Pour 1/10 de cent. cube, agglutination très rapide et totale; en moins d'une heure, un coagulum dense se déposait au fond des tubes.

Pour 1/100 de cent. cube, agglutination rapide et totale; coagulum dense formé dans la journée.

Pour 1/1.000 de cent. cube, agglutination lente; le lendemain, coagulum fragile.

Pour 1/10.000 de cent. cube, rien le jour même; le lendemain, trace d'agglutination dans quelques cas seulement.

En résumé, *les 21 sortes de graines de ricin renferment l'agglutinine spécifique*; *leur teneur est sensiblement la même*; 1/1.000 de cent. cube de leur extrait aqueux à 50 p. 100 agglutine encore 1 cent. cube d'hématies de lapin, dans nos conditions expérimentales.

Nous sommes donc amené à conclure que la présence, dans les graines, de la toxine et de l'agglutinine, en quantité sensiblement constante pour un même poids de substance végétale, doit être considérée, jusqu'à nouvel ordre, comme une propriété fixe du genre Ricin.

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

28e ANNÉE SEPTEMBRE-OCTOBRE 1914 N° 9-10
(Paru le 25 Décembre 1914

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

LES LEISHMANIOSES CHEZ LES ANIMAUX

par A. LAVERAN.

L'étude des leishmanioses naturelles ou expérimentales chez les animaux présente un grand intérêt; la leishmaniose naturelle du chien est probablement de même nature que le kala-azar infantile ou méditerranéen, et il est vraisemblable que le chien joue un rôle dans la propagation de cette maladie. L'étude des leishmanioses humaines est difficile quand on se borne aux faits que peuvent fournir l'observation des malades et les nécropsies; grâce à la réceptivité de certains animaux pour les *Leishmania*, nous pouvons étudier à loisir, dans les laboratoires, beaucoup de problèmes d'une grande importance, tels que les modes de transmission des *Leishmania* et les caractères communs ou distinctifs des différents virus, d'après les infections auxquelles ils donnent lieu chez différentes espèces animales. J'étudierai successivement :

I. La leishmaniose naturelle du chien;

II. Les infections expérimentales produites par la *L. infantum*;

III. Les infections expérimentales produites par la *L. Donovani*;

IV. Les infections naturelles ou expérimentales produites par la *L. tropica*.

I. — LEISHMANIOSE CANINE NATURELLE

Historique. Répartition. — En 1908, C. Nicolle et C. Comte ont publié la première observation de leishmaniose naturelle du chien (1). Il s'agissait d'un caniche noir, très amaigri, présentant un écoulement purulent d'une des oreilles, asphyxié à la fourrière de Tunis. La rate était un peu hypertrophiée. Des *Leishmania* existaient en assez grand nombre dans la rate et dans la moelle osseuse, en très petit nombre dans le foie.

C. Nicolle et C. Comte qui, en 1908, ont examiné 222 cadavres de chiens provenant de la fourrière de Tunis, ont constaté que 4 de ces animaux, soit 1,8 p. 100, étaient atteints de leishmaniose (2). De 31 chiens des environs de Tunis, de Gafsa et de Sfax examinés, aucun ne fut trouvé infecté.

Ces faits ont été confirmés par un grand nombre d'observateurs, non seulement pour la Tunisie, mais pour toutes les régions dans lesquelles le kala-azar infantile existe à l'état endémique.

W.-L. Yakimoff et Mme Yakimoff qui ont répété, à Tunis, les recherches de Nicolle et Comte sur les chiens de la fourrière (3) ont trouvé 5 chiens infectés de leishmaniose sur 299, soit une proportion 1,67 p. 100, presque identique à celle signalée par Nicolle et Comte. L'infection était légère chez 2 chiens, forte chez les 3 autres.

Gray, qui a repris ces recherches à Tunis, a constaté l'infection de 2 chiens sur 127 examinés, soit une proportion de 1,6 p. 100 (4).

Enfin C. Nicolle, dans une dernière série de recherches, sur les chiens sacrifiés à la fourrière de Tunis, mais qui n'a porté, cette fois, que sur les chiens maigres et malades, au lieu de porter, comme précédemment, sur l'ensemble des animaux, a trouvé que la proportion des chiens infectés de leishmaniose

(1) C. Nicolle et C. Comte, *Acad. des Sciences*, 6 avril 1908.
(2) C. Nicolle et C. Comte, *Arch. de l'Institut Pasteur de Tunis*, 1908, p. 109.
(3) W.-L. Yakimoff et et N. Kohl-Yakimoff, *Arch. de l'Institut Pasteur de Tunis*, 1911, fasc. 4.
(4) A.-C.-H. Gray, *Soc. de path. exotique*, 12 mars 1913.

était de 5,50 p. 100. Cette proportion a été à peu près la même aux différentes saisons (1).

En dehors des enquêtes systématiques faites à Tunis, 2 chiens atteints de leishmaniose ont été observés, le premier par C. Nicolle à Khereddine, près de La Goulette (Tunisie), le second par Langeron, à Tunis, en septembre 1911.

Ed. Et. Sergent et Senevet ont constaté l'existence de la leishmaniose canine à Alger (2). Senevet a trouvé, au printemps, 3 chiens infectés sur 186, soit 1,6 p. 100 et, en été, 4 chiens infectés sur 45, soit 8,8 p. 100. La leishmaniose canine serait donc plus fréquente en été qu'au printemps.

En 1912, d'août à septembre, Lemaire, Ed. Sergent et Lhéritier ont examiné 205 chiens tués à la fourrière d'Alger; 2 animaux seulement étaient infectés de *Leishmania*, soit, à très peu près, une proportion de 1 p. 100. En 1913, d'avril à juillet, les mêmes observateurs ont examiné 272 chiens provenant également de la fourrière d'Alger sur lesquels 7 ont été trouvés infectés, soit une proportion de 2,57 p. 100 (3). De ces chiffres on ne peut pas conclure à la prédominance au printemps de la leishmaniose canine, parce que l'examen des chiens n'a pas été fait dans les mêmes conditions en 1912 et 1913. En 1912, les auteurs ont porté le diagnostic après examen de frottis de rate et de moelle osseuse, tandis qu'en 1913, ils ont procédé par ensemencement de la moelle osseuse, ce qui constitue un moyen de diagnostic beaucoup plus précis que l'examen histologique de frottis de la rate et de la moelle osseuse.

Critien a constaté que la leishmaniose était commune à Malte chez les chiens, comme chez les enfants; sur 30 chiens examinés, 3 avaient des *Leishmania* dans la rate (4).

Wenyon, qui a recherché à Malte la fréquence de la leishmaniose canine, est arrivé à un chiffre très voisin de celui de

(1) C. Nicolle, *Soc. de path. exotique*, 10 juin 1914.

(2) Ed. et Et. Sergent, *Soc. de path. exotique*, 12 octobre 1910. — G. Senevet, *même Soc.*, 14 février 1912.

(3) G. Lemaire, Ed. Sergent et A. Lhéritier, *Soc. de path. exotique*, 8 octobre 1913.

(4) A. Critien, *Arch. de l'Institut Pasteur de Tunis*, 1910 et *Ann. of trop. med. a. parasitol.*, avril 1911.

Critien : sur 46 chiens examinés, 6 ont été trouvés infectés (1).

D. Alvarès et Pereira da Silva, sur 300 chiens examinés à Lisbonne, en ont trouvé 8 qui étaient infectés de leishmaniose. Dans une autre série de recherches, P. da Silva a noté, à Lisbonne, 4 chiens infectés, sur 109 examinés, et les *Leishmania* n'ont été recherchées que dans la rate (2).

G. Pittaluga, en Espagne, a observé 2 chiens infectés de leishmaniose aux environs de Tortosa et un troisième chien infecté à Beninar [province d'Almeria (3)].

On sait que de nombreux cas de kala-azar infantile ont été signalés depuis quelques années dans l'Italie méridionale, principalement en Calabre et en Sicile ; la leishmaniose canine est enzootique dans les mêmes régions.

R. Jemma, à Palerme, a examiné 227 chiens avec résultat négatif au point de vue de la leishmaniose, mais, aux environs de Palerme, il a constaté à deux reprises l'infection du chien dans les mêmes localités que le kala-azar infantile ; un des chiens infectés vivait dans le voisinage immédiat d'un enfant atteint de kala-azar (4).

A Bordonaro, près de Messine, Basile, sur 33 chiens examinés (par ponction du fémur), a trouvé 27 fois des *Leishmania* ; il y avait des chiens infectés dans toutes les maisons renfermant des enfants atteints de kala-azar (5).

Si, en Italie, la leishmaniose canine a été signalée dans toutes les régions d'endémicité du kala-azar infantile, il s'en faut qu'il y ait une relation étroite et constante entre les chiffres de fréquence de ces maladies chez le chien et chez l'enfant. A Palerme, Caronia et di Giorgio n'ont trouvé qu'un chien infecté sur 1.005 chiens examinés (6) et, à Rome, sur 60 chiens du dépôt municipal examinés, 16 ont été trouvés infectés (7) ; or, à Palerme, le kala-azar est endémique, tandis que la région de Rome paraît indemne.

(1) C.-M. Wenyon, *Soc. of trop. med. a. hyg.*, janvier 1914.

(2) D. Alvarès, *Med. contemporanea*, 20 mars 1910. — D. Alvarès et E. Pereira da Silva, *même recueil*, 26 mars 1911 et *Arq. do Inst. bact. Camara Pestana*, juin 1914.

(3) G. Pittaluga, *Pathologica*, 1er mars 1914.

(4) R. Jemma, *Pathologica*, 1er juin 1910 et 1er août 1912.

(5) C. Basile, *Rendiconti d. R. Accad. dei Lincei*, 1910, t. XIX, p. 158.

(6) Caronia et di Giorgio, *Pathologica*, 15 avril 1914.

(7) C. Basile, *op. cit.*

Sur 310 chiens examinés à Marseille par Pringault, 5 ont été trouvés infectés de leishmaniose, soit une proportion de 1,61 p. 100 (1). Jusqu'ici aucun cas de kala-azar infantile n'a été observé dans la région de Marseille.

La leishmaniose canine est commune en Grèce. Sur 589 chiens examinés à Athènes par Cardamatis, 81 étaient parasités, soit 13,75 p. 100 (2). Sur 48 chiens examinés par Lignos dans l'île d'Hydra, 8 étaient infectés de leishmaniose, soit 16,66 p. 100 (3); les recherches de Lignos ont été faites de mai à octobre 1912.

Dschunkowsky et Luhs ont signalé l'existence de la leishmaniose canine en Transcaucasie (4); la maladie ne serait pas rare dans cette région, d'après Marzinowsky (5).

A Taschkent (Turkestan), W.-L. Yakimoff, Mme Yakimoff et N.-J. Schokor, sur 647 chiens examinés d'avril à septembre 1913, en ont trouvé 157 qui étaient infectés de leishmaniose, ce qui donne la forte proportion de 24,26 p. 100 (6).

Au Soudan, Bousfield a trouvé dans la rate d'un chien qui vivait dans la même hutte qu'un malade atteint de kala-azar très aigu des éléments parasitaires qui paraissent être des *Leishmania* (7).

Jusqu'ici, la leishmaniose naturelle du chien n'a pas été observée dans les régions où le kala-azar indien est endémique.

Evolution. Symptômes. — La maladie est tantôt légère et latente, tantôt grave; la durée de son évolution, plus ou moins rapide, est difficile à fixer, attendu que les débuts sont toujours méconnus.

Dans la forme légère ou latente, la maladie ne peut être

(1) E. Pringault, *Soc. de path. exotique*, 10 janvier et 10 juin 1914.
(2) J. Cardamatis, *Soc. de path. exotique*, 14 février 1912.
(3) A. Lignos, *Soc. de path. exotique*, 12 février 1913.
(4) E. Dschunkowsky et J. Luhs, *IXe Congrès internat. de méd. vétér.*, La Haye, septembre 1909.
(5) E.-I. Marzinowsky, *Soc. de path. exotique*, 11 décembre 1912.
(6) N. Kohl-Yakimoff, W.-L. Yakimoff et N.-J. Schokhor, *Soc. de path. exotique*, 11 juin 1913. — W.-L. Yakimoff et N.-J. Schokhor, *même Soc.* 11 mars 1914.
(7) L. Bousfield, *Jl. R. Army med. Corps*, 1910 et *Transact. of the Soc. of trop. med. a. hyg.*, avril 1912.

reconnue que par les procédés de recherche des *Leishmania* qui seront indiqués plus loin. (V. Diagnostic.)

Les manifestations cutanées qu'on observe parfois chez les chiens atteints de leishmaniose, dépendent en général, d'affections parasitaires indépendantes de cette maladie (P. da Silva.)

Dans les formes graves, le symptôme principal, et souvent unique, est fourni par l'amaigrissement. Chez certains animaux, le poil tombe par places ou bien de petites ulcérations se produisent aux muqueuses buccale, conjonctivales ou nasale. A une période avancée de la maladie, les chiens sont apathiques, ils restent couchés et, quand on les oblige à se lever, ils montrent des signes d'une faiblesse surtout apparente dans les pattes postérieures. Chez quelques animaux, il existe une véritable parésie du train postérieur. L'anémie est généralement peu marquée, l'appétit est conservé jusqu'à la période terminale; à ce moment, on observe parfois de la diarrhée. La rate est souvent hypertrophiée, mais cette hypertrophie est très difficile à constater. La mort se produit d'ordinaire en hypothermie. Les *Leishmania* sont généralement assez nombreuses pour que leur recherche soit facile dans la moelle osseuse, dans la rate ou dans le foie (V. diagnostic).

Quelques chiens présentent de la kératite avec opacité consécutive d'une cornée ou des deux cornées.

La durée approximative de la maladie varie de trois mois à un an (1).

Anatomie pathologique. — La rate est souvent augmentée de volume, elle est ramollie dans les formes aiguës de l'infection, dure, comme sclérosée, chez les chiens qui sont sacrifiés à une période avancée de la maladie. Le foie peut être aussi augmenté de volume dans les formes aiguës, sclérosé dans les formes chroniques. La moelle osseuse est rouge, diffluente.

C'est dans la moelle osseuse que l'on trouve d'ordinaire les *Leishmania* en plus grand nombre ; parmi les viscères les plus

(1) Consulter pour la description de la leishmaniose naturelle du chien : C. Basile, *R. Accad. dei Lincei*, 20 novembre 1910; W.-L. Yakimoff et N. Kohl-Yakimoff, *Arch. de l'Inst. Pasteur de Tunis*, 1911; G. Lemaire, Ed. Sergent et A. Lhéritier, *Revue méd. d'Alger*, janvier 1914.

atteints, il faut citer en premier lieu la rate, en second lieu le foie. On trouve assez souvent des *Leishmania* dans les ganglions lymphatiques. Les parasites, très nombreux dans la moelle osseuse et dans la rate, chez les chiens atteints d'infections aiguës graves, sont si rares dans les formes légères ou à la période terminale des infections en voie de guérison que leur recherche présente de sérieuses difficultés.

C. Basile a constaté, à l'autopsie de deux chiens atteints de leishmaniose naturelle, la présence de *Leishmania* dans la moelle épinière, ce qui rendrait compte des symptômes spinaux assez fréquents à la dernière période de la maladie (1). Lacava avait noté précédemment l'existence de *Leishmania* dans le liquide cérébro-spinal d'un enfant atteint de kala-azar.

Lemaire, Ed. Sergent et Lhéritier ont signalé l'existence de *Leishmania* dans l'épaisseur de la cornée d'un chien atteint de leishmaniose compliquée de kératite (2).

Agent pathogène. — Les *Leishmania* que l'on trouve chez les chiens infectés naturellement sont identiques, morphologiquement, à celles du kala-azar humain, ce qui me dispense d'en faire la description; comme ces dernières, elles donnent, dans le milieu de Novy simplifié, de belles cultures de Flagellés qu'il est impossible de distinguer, d'après leurs caractères morphologiques, des Flagellés de culture des *Leishmania Donovani* ou des *L. infantum*. Chez les chiens infectés naturellement, la répartition des parasites est la même que chez les chiens atteints de leishmaniose expérimentale. Dans les deux cas, c'est la moelle osseuse qui est le siège principal et parfois unique des *Leishmania*; par ordre de fréquence des parasites, il faut citer ensuite la rate et le foie.

Les animaux sensibles au virus humain sont également sensibles au virus canin.

Nicolle et Conor ont constaté que le singe était sensible au virus canin comme au virus humain du kala-azar et que les localisations des parasites étaient les mêmes chez les singes inoculés avec l'un ou l'autre de ces virus (3).

(1) C. Basile, *R. Accad. dei Lincei*, 20 avril 1913.
(2) G. Lemaire, Ed. Sergent et A. Lhéritier, *Soc. de path. exotique*, 11 mars 1914.
(3) C. Nicolle et M. Conor, *Soc. de path. exotique*, 12 juin 1912.

On peut produire, chez la souris blanche, des infections généralisées par l'inoculation intrapéritonéale du virus de la leishmaniose naturelle du chien, comme par l'inoculation du virus humain du kala-azar (1).

Si grandes que soient les ressemblances entre la leishmaniose naturelle du chien et la leishmaniose expérimentale produite par l'inoculation du virus humain, quelques observateurs contestent encore l'identité de ces infections.

Gabbi, Spagnolio et Giugni ont comparé le tableau clinique de la leishmaniose naturelle du chien à celui du kala-azar chez l'homme et ont conclu des dissemblances existant entre ces tableaux à l'existence d'entités morbides distinctes (2); cette comparaison prête à la critique : il est assez naturel en effet que l'homme et le chien ne réagissent pas de la même manière ; si les observateurs précités avaient comparé le tableau clinique de la leishmaniose naturelle du chien, non pas au tableau clinique de la maladie chez l'homme, mais à celui de l'infection produite chez le chien par l'inoculation du virus du kala-azar, ils auraient vu que, dans les deux cas, l'évolution et les symptômes de la maladie étaient les mêmes.

Les auteurs italiens objectent, avec plus de raison, qu'il n'y a pas de rapport exact et constant entre la fréquence de la leishmaniose naturelle chez le chien et celle du kala-azar infantile.

Scordo, Giugni et Moldovan ont recherché comment les cultures de la *Leishmania* du chien (infection naturelle) et de la *L. infantum* se comportaient *in vitro* sous l'action du sérum de sujets atteints de kala-azar (3). D'après Scordo, les flagellés des deux espèces de cultures s'agglutinent, s'immobilisent et se désagrègent au bout d'un certain temps, mais ces phénomènes se produisent avec un notable retard dans les cultures de la *Leishmania* de l'infection naturelle du chien. Giugni et Moldovan, plus affirmatifs, concluent que dans des conditions

(1) A. Jannot, *Soc. de path. exotique*, 10 décembre 1913.

(2) A. Spagnolio et Fr. Giugni, *Malaria e malattie dei paesi caldi*, 20 août 1914, anno V, p. 297.

(3) F. Scordo, *Malaria e malattie dei paesi caldi*, 20 août 1914. — G. Spagnolio et Fr. Guigni, *même recueil*, même numéro.

d'expérience identiques, les deux cultures se comportent d'une manière complètement différente.

Les phénomènes sur lesquels Scordo, Giugni et Moldovan se basent pour distinguer la *Leishmania* de l'infection naturelle du chien de la *Leishmania* du kala-azar infantile sont bien loin d'être assez caractéristiques pour trancher la question. En ce qui me concerne, j'ai cherché plusieurs fois à obtenir des agglutinations dans des cultures de *Leishmania infantum* à l'aide du sérum d'animaux en cours d'infection par cette *Leishmania*, ou après guérison, et les résultats obtenus ont été nuls ou incertains.

Toutes les probabilités paraissent être en faveur de l'identité de la *L. infantum* et de la *Leishmania* de l'infection naturelle du chien; toutefois il n'est pas douteux que la question présente encore des obscurités. Pourquoi le rapport de fréquence de la leishmaniose du chien et de la leishmaniose infantile est-il aussi inconstant? Pourquoi est-il si rare de constater l'existence de chiens infectés de leishmaniose dans les maisons où se trouvent des malades atteints de kala-azar? Enfin si, comme cela paraît probable, le kala-azar indien est de même nature que le kala-azar méditerranéen, comment se fait-il que, dans l'Inde, toutes les recherches faites pour découvrir des cas de leishmaniose naturelle du chien soient demeurées infructueuses? Il est probable qu'il ne sera possible de répondre à ces questions que lorsque nous connaîtrons le mode de diffusion des leishmanioses.

Modes d'infection. — Dès 1908, Nicolle a émis l'hypothèse que la leishmaniose naturelle du chien et le kala-azar infantile étaient propagés par les puces (1), et quelques faits expérimentaux ont paru confirmer cette opinion.

D'après Basile, la *L. infantum* pourrait évoluer dans le tube digestif de la puce du chien, *Ctenocephalus canis*, et de la puce de l'homme, *Pulex irritans*, et ces deux insectes seraient capables de propager la maladie chez l'homme, comme chez le chien.

Le même observateur a réussi à infecter un jeune chien en le

(1) C. Nicolle, *Arch. de l'Institut Pasteur de Tunis*, 1908, fasc. III, p. 116.

plaçant dans une cage voisine de celle d'un chien fortement infecté de leishmaniose et ayant de nombreuses puces, qui émigrèrent en partie sur le jeune chien. Basile a infecté, d'autre part, une souris en lui inoculant le contenu du tube digestif de puces nourries sur des chiens atteints de leishmaniose (1).

Ed. et Et. Sergent, A. Lhéritier et G. Lemaire ont cité le fait suivant : une chienne en bonne santé, piquée par de nombreuses puces nourries sur un chien atteint de leishmaniose, s'est infectée ; à l'autopsie, on a constaté l'existence de *Leishmania* dans la rate et dans la moelle osseuse (2).

On peut objecter que la leishmaniose naturelle du chien n'est pas rare dans les régions où ces expériences ont été faites et que les procédés employés par les auteurs précités pour constater l'absence de *Leishmania* chez les chiens soumis aux piqûres de puces, la ponction du foie notamment, sont tout à fait insuffisants. La chienne de Ed. et Et. Sergent, Lhéritier et Lemaire, essayée par ponction du foie au début de l'expérience, n'a montré, à l'autopsie, aucune *Leishmania* dans le foie, alors qu'il y avait des *Leishmania* dans la rate et dans la moelle osseuse, ce qui prouve que le procédé de diagnostic employé était insuffisant.

Les inoculations, en apparence positives, faites à différents animaux avec le contenu des puces ayant sucé du sang de sujets infectés de leishmaniose ne sont pas non plus probantes : l'infection des puces par des Flagellés qui n'ont rien à faire avec les *Leishmania* est très fréquente (3) et il résulte des recherches de Laveran et Franchini que ces Flagellés des puces, de la puce du chien en particulier, *Ctenocephalus canis*, peuvent donner lieu, chez certaines espèces animales, à des

(1) C. Basile, *R. Accad. dei Lincei*, 20 novembre 1910, 8 janvier, 19 février, 19 mars 1911 et 6 avril 1913.

(2) Ed. et Et. Sergent, A. Lhéritier et G. Lemaire, *Soc. de path. exotique*, 9 octobre 1912.

(3) A. Balfour, *Journal of Hygiene*, 1906, p. 1040 et *Second Report of the Wellcome research Laboratories*, Khartoum, 1906, p. 105. — Patton et Strickland, *Parasitology*, 1908, p. 333. — G. Sangiorgi, *Pathologica*, 15 janvier 1911. — V. Marzocchi, *Pathologica*, 1911, p. 256. — A. Porter, *Parasitology*, octobre 1911. — H.-B. Fantham, *Brit. med. Assoc.*, Liverpool, juillet 1912 et *Brit. med. Journal*, 2 novembre 1912. — Ed. Chatton et Delanoe, *Soc. de Biologie*, 27 juillet 1912. — W. Nöller, *Arch. f. Protistenkunde*, 17 mai 1912. — H.-B. Fantham et A. Porter, *Ann. trop. med. a. parasitol.*, 30 décembre 1913. — A. Laveran, *Soc. de path. exotique*, 1913, t. VI, p. 113.

infections légères, caractérisées par la présence dans le foie, dans la rate et dans la moelle osseuse, d'éléments parasitaires ayant une grande ressemblance avec les *Leishmania* (1).

D'après Basile, les parasites que l'on trouve dans les puces infectées sur les enfants ou sur les animaux atteints de leishmaniose seraient bien distincts, morphologiquement, des *Herpetomonas* propres aux puces. Cette assertion me paraît très contestable; j'ai trouvé chez des puces infectées naturellement, et n'ayant certainement sucé le sang d'aucun sujet atteint de leishmaniose, des parasites qui avaient tout à fait l'aspect des *Leishmania*.

Massaglia (2), Marshall (3), Pereira da Silva (4), Wenyon (5) ont essayé sans succès d'infecter des chiens à l'aide de puces ayant sucé du sang d'animaux atteints de leishmaniose; les expériences de Wenyon, faites à Malte, dans d'excellentes conditions, sont particulièrement intéressantes. Wenyon avait amené d'Angleterre 4 chiens; 2 de ces chiens furent soumis aux piqûres de nombreuses puces nourries sur un chien infecté de leishmaniose; ces deux chiens moururent d'anémie et on pouvait supposer qu'ils s'étaient contaminés, mais il fut impossible de trouver des *Leishmania* à l'examen des frottis du foie, de la rate ou de la moelle osseuse, et des essais de culture donnèrent des résultats négatifs.

D'après Basile, les conditions de température ont une grande importance dans les expériences de transmission de la leishmaniose par les puces; les températures de 18 à 30 degrés seraient seules favorables au développement des *Leishmania*; au-dessous de 18 degrés, et au-dessus de 30 degrés, les puces ne pourraient pas s'infecter. On s'expliquerait ainsi les résultats négatifs obtenus par quelques observateurs. On se place aussi dans des conditions défavorables à l'expérience quand on nourrit les puces sur des animaux faiblement infectés, ayant des *Leishmania* très rares dans le sang (6).

(1) A. Laveran et G. Franchini, *Acad. des Sciences*, 1er septembre et 3 novembre 1913; *Soc. de path. exotique*, 8 juillet 1914.
(2) A. Massaglia, *Pathologica*, 1er juin 1912.
(3) W.-E. Marshall, *Jl. R. Army med. Corps*, septembre 1912.
(4) P. da Silva, *Arq. do Inst. bacter. Camara Pestana*, 1913, t. VI, fasc. 2.
(5) C.-M. Wenyon, *Soc. of trop. med. a. hyg.*, janvier 1914.
(6) C. Basile, *R. Accad. dei Lincei*, 5 et 19 avril 1914.

On conçoit que les expériences sur le rôle des puces dans la transmission de la leishmaniose soient difficiles à réaliser et que, si même ces insectes ont le rôle qui leur a été attribué par Nicolle et Basile, les résultats soient souvent négatifs; les *Leishmania* sont, en effet, toujours rares ou très rares dans le sang des chiens infectés et, d'autre part, la sensibilité des chiens au virus humain du kala-azar et même au virus canin n'est pas très grande. On verra dans le chapitre suivant que, pour infecter des chiens avec la *L. infantum*, il faut leur inoculer de très fortes doses de virus. Avec le virus de la leishmaniose canine, on réussit facilement un ou deux passages par chiens, mais il est difficile de pousser au delà du troisième passage (1).

Les recherches de Franchini tendent à démontrer que les Culicides jouent un rôle important dans la transmission de la *L. infantum* (2). D'après cet observateur, on réussirait assez facilement à infecter divers culicides et, en particulier l'*Anopheles maculipennis*, en leur faisant sucer soit des cultures de *Leishmania*, soit le produit de la ponction de la rate de sujets infectés de kala-azar. Ici, comme pour les puces, on se heurte malheureusement à l'objection fournie par l'existence fréquente, dans le tube digestif des moustiques, de protozoaires ayant une grande ressemblance avec les *Leishmania*. D'autre part, il ne suffirait pas de démontrer que les *Leishmania* peuvent vivre et se développer dans le tube digestif de certains moustiques, il faudrait prouver que les moustiques ainsi infectés sont susceptibles de transmettre la maladie, ce qui n'a pas été fait jusqu'ici.

Patton qui, en nourrissant des punaises (*Cimex rotundatus* ou *C. lectularius*) sur des sujets ayant des *Leishmania Donovani* nombreuses dans le sang, a réussi à observer le développement complet des parasites du kala-azar indien dans le tube digestif des punaises, a conclu de ses expériences que les punaises sont les agents de propagation du kala-azar indien et probablement aussi du kala-azar méditerranéen (3).

(1) C. Nicolle et Marthe Conor, *Soc. de path. exotique*, 10 juin 1914.

(2) G. Franchini, *Malaria e malattie dei paesi caldi*, novembre 1911; *Ann. of trop. med. a. parasit.*, mai 1912; *Riforma med.*, 7 septembre et 7 décembre 1912.

(3) W.-S. Patton, *Scientif. Mem. by Offic. of the med. a. sanit. Dep. of the Gov. of India*, 1912. N. S., n° 53.

On trouve parfois (rarement il est vrai), chez les punaises, comme chez les puces et les moustiques, des Flagellés qui peuvent être confondus avec des formes d'évolution des *Leishmania* (1); afin de se mettre à l'abri de cette cause d'erreur, Patton s'est servi, pour ses expériences, de punaises issues d'œufs, au laboratoire, qui ont été nourries à l'état de nymphes sur un malade atteint de kala-azar ayant des *Leishmania* nombreuses dans le sang; c'est dans les nymphes de *C. rotundatus* et de *C. lectularius* ainsi infectées qu'il a pu suivre l'évolution des parasites qu'il divise en stades préflagellé, flagellé et post-flagellé.

Les observations de Patton sont très intéressantes, mais il reste à compléter la démonstration qu'il a commencée en montrant que les punaises parasitées sont susceptibles de transmettre l'infection, ce qui n'a pas été fait jusqu'ici.

Franchini a essayé sans succès d'infecter des *Cimex lectularius* avec des cultures de la *L. infantum* (2).

On voit que, malgré les nombreuses recherches entreprises pour découvrir le mode de propagation de la leishmaniose canine ou de la leishmaniose humaine, la question est encore très obscure.

Diagnostic. Pronostic. — Comme on l'a vu plus haut, les symptômes de la leishmaniose canine sont rares et peu caractéristiques, si même ils ne font pas complètement défaut. L'amaigrissement, qui est le symptôme le plus constant, s'observe dans un grand nombre de maladies. Le seul moyen de diagnostic consiste à rechercher les *Leishmania* et il faut bien savoir que la découverte de ces parasites est difficile quand ils n'existent qu'en très petit nombre, comme cela arrive dans les formes légères ou chez les animaux en voie de guérison. Même à l'autopsie, alors qu'on peut multiplier les examens histologiques de frottis de la moelle des os, de la rate et du foie, on n'arrive pas toujours à déceler ainsi l'existence des *Leishmania*. Laveran et Pettit ont montré qu'il y avait lieu

(1) R.-B. Archibald, *Fourth Rep. Wellcome trop. research Labor.*, Khartoum, 1911, t. A, p. 179.

2) G. Franchini, *Malaria e malattie dei paesi caldi*, juin 1911 et *Soc. de path. exotique*, 11 décembre 1912.

de recourir dans ces cas à l'ensemencement dans le milieu de Novy simplifié qui donne souvent des résultats positifs, alors que la recherche directe des parasites en avait donné de négatifs (1). On a vu plus haut que c'est la moelle osseuse qui contient, en général, le plus grand nombre de parasites chez le chien, c'est donc à l'ensemencement de ce tissu qu'il faut avoir recours; il est d'ailleurs plus facile d'ensemencer une parcelle de moelle osseuse qu'une parcelle de rate. Après avoir enlevé un fémur, on le scie et on flambe une des surfaces de section, on plonge dans la moelle, généralement ramollie, un fil de platine un peu rigide, recourbé en anse à son extrémité, après l'avoir flambé; on charge sur l'anse une parcelle de la moelle que l'on dépose dans l'exsudat liquide d'un tube de culture; on peut préparer ainsi plusieurs tubes; 2 à 3 suffisent en général. Au bout d'un temps qui varie avec la richesse en *Leishmania* du tissu ensemencé on voit apparaître les flagellés caractéristiques. Quand les *Leishmania* sont extrêmement rares, l'apparition des flagellés peut être tardive; il faut conserver les tubes de culture pendant un mois au moins. Les tubes doivent être placés dans une étuve à température constante, réglée à 22 degrés.

La recherche des *Leishmania* est naturellement plus difficile chez le chien vivant que chez le chien mort. L'examen direct des tissus, suffisant dans les cas d'infection forte, doit être complété dans les cas d'infection faible, avec examens histologiques négatifs, par l'ensemencement du sang ou de lambeaux des tissus.

Nicolle et Conor ont préconisé la ponction du foie pour le diagnostic de la leishmaniose du chien, la ponction de la rate n'étant pas possible chez cet animal; le siège d'élection est le 10e espace intercostal droit à 1 ou 2 travers de doigt des apophyses épineuses (2).

La ponction du foie ne permet de déceler l'existence des *Leishmania* que lorsqu'il s'agit d'infections graves; dans beaucoup de cas ce procédé de diagnostic est tout à fait insuffisant.

L'examen de la moelle des os qui, comme on l'a vu plus

(1) A. Laveran et A. Pettit, *Soc. de path. exotique*, 8 décembre 1909.
(2) C. Nicolle et A. Conor, *Arch. de l'Inst. Pasteur de Tunis*, 1910, fasc. III, p. 109.

haut, est le siège d'élection des *Leishmania* chez le chien, constitue un procédé de diagnostic plus exact que la ponction du foie surtout si, en outre de l'examen histologique, on fait des ensemencements; il est facile de trépaner le fémur à sa face externe.

Dans les infections fortes, on constate assez facilement par l'examen histologique la présence des *Leishmania* dans le sang; il est indiqué d'examiner, dans les frottis de sang desséché, la partie terminale qui renferme des leucocytes en grand nombre, on peut aussi faire des préparations un peu épaisses que l'on colore au Romanowsky sans fixer.

Novy a conseillé de recueillir 10 cent. cubes environ de sang chez le chien suspect et d'ensemencer avec ce sang une vingtaine de tubes de culture (1). J'ai réussi à déceler plusieurs fois la leishmaniose du chien en ensemençant 2 à 3 tubes seulement, chacun avec une dizaine de gouttes de sang; il est très facile, chez le chien, de prendre aseptiquement du sang dans les saphènes externes.

Il est probable que la leishmaniose naturelle du chien se termine souvent par guérison comme la leishmaniose expérimentale dont il sera question dans un autre chapitre.

Prophylaxie. — La prophylaxie de la leishmaniose canine est d'un grand intérêt attendu que, dans l'état actuel de la science, il y a des probabilités pour que la maladie puisse être transmise du chien à l'enfant.

Nous avons vu que le diagnostic ne pouvait être fait que par la recherche des *Leishmania* chez le chien vivant ou mort; il est à désirer que les vétérinaires se familiarisent avec les procédés d'examen qui ont été exposés plus haut, qu'ils sachent reconnaître, dans les préparations histologiques, les *Leishmania* dont l'aspect est d'ailleurs si caractéristique, et qu'ils puissent procéder à la recherche de ces parasites par la méthode de l'ensemencement dans le milieu de Novy simplifié.

Les chiens reconnus atteints de leishmaniose seront abattus ainsi que les chiens errants.

(1) F.-G. Novy, *Soc. de path. exotique*, 21 juillet 1909.

L'importation des chiens provenant de régions contaminées sera prohibée.

Dans les régions menacées, on procédera à des examens méthodiques des chiens abattus en fourrière, afin de connaître la fréquence de la maladie, et de se rendre compte des progrès qu'elle pourrait faire.

On ne connaît pas de traitement efficace de la leishmaniose canine.

(*A suivre.*)

RECHERCHES SUR LE PROTEUS VULGARIS

par Albert BERTHELOT.

(Laboratoire de M. Metchnikoff.)

Les recherches que je vais exposer portent toutes sur le *Proteus vulgaris*, mais elles forment cependant deux groupes bien distincts. Les unes, en effet, ont eu simplement pour objet l'étude critique d'un petit nombre de caractères différentiels de ce microbe : coloration par la méthode de Gram, action sur les hydrates de carbone, production de phénol et d'indol, tandis que les autres avaient principalement pour but la détermination des propriétés pathogènes d'un *Proteus* d'origine bien déterminée.

Grâce à la bienveillance de M. Metchnikoff et à l'amabilité de quelques-uns de mes collègues j'ai pu disposer, pour mes recherches, de soixante et une races de *Proteus*, de provenances très diverses ainsi que l'on peut s'en rendre compte par le tableau ci-dessous :

NUMÉROS	ÉCHANTILLONS ISOLÉS	PROVENANCE
1 à 24 35 à 40 45 à 57	Par M. Metchnikoff . . .	Diarrhées infantiles (Paris).
41	— M. Metchnikoff . . .	Matières d'une adulte atteinte de troubles intestinaux chroniques.
25 à 34	— M. D.-M. Bertrand .	Diarrhées infantiles (Londres).
43	— M. Fosse	Otite.
44	— M. H. Tissier	Viande en putréfaction.
58 et 59	— M. M. Cohendy . . .	Vomiques.
60	— M. D.-M. Bertrand .	Otite.
61	— M. D.-M. Bertrand .	Ozène.
42	Identifié par M. Legroux.	Collection de l'Institut Pasteur. Origine inconnue. Cultivé depuis longtemps sur gélose ordinaire.

Malgré cette diversité d'origine tous présentaient à un degré variable (1) les propriétés suivantes : mobilité, liquéfaction de la gélatine, coagulation du lait suivie de la digestion du coagulum, production d'ammoniaque et d'hydrogène sulfuré ; toutes possédaient donc un ensemble de caractères qu'accuse toujours le microbe décrit par Hauser (2) sous le nom de *Proteus vulgaris* et étudié dans certains ouvrages récents sous celui de *Bacillus vulgaris*. Au point de vue des propriétés sur lesquelles l'entente des bactériologistes n'est pas encore faite (fonction indologène, action sur les sucres) ces races semblaient différer quelque peu entre elles; mais, ainsi qu'on le verra plus loin, j'ai pu établir qu'il s'agissait de différences apparentes et qu'elles appartenaient bien toutes à une seule et même espèce.

I. — Le proteus et la méthode de Gram.

Tous les bactériologistes ne sont pas d'accord sur la manière dont se comporte ce microbe quand on le traite par la méthode de Gram. Les uns, et ce sont les plus nombreux et les plus anciens, le considèrent comme prenant le Gram; les autres affirment qu'il se décolore toujours après l'action de la solution iodo-iodurée.

Bien des auteurs ont dû être frappés de cette divergence d'opinions, mais cependant il en est peu qui aient tenté de faire cesser l'indécision qui persistait sur ce point important. C'est Léon Feltz (3) qui le premier, en 1900, aborda sérieusement ce sujet; ses essais portèrent sur quatre *Proteus* d'origines diverses qu'il étudia très complètement à différents points de vue.

A l'égard des affinités colorantes, après avoir répété maintes fois ses expériences dans des conditions variées, il en arriva aux conclusions suivantes : « Le *Proteus vulgaris* prend toujours le Gram, mais il faut pour cela opérer sur des cultures jeunes, ensemencées sur des milieux où il pousse bien; ces conditions

(1) Certains échantillons récemment isolés manifestaient, à la température du laboratoire, un pouvoir protéolytique très faible, mais celui-ci ne tardait pas à s'accroître à la suite des passages en milieux usuels.

(2) Gustav Hauser, *Ueber Fäulnissbakterien; ein Beitrag zur Morphologie der Spaltpilze*, 1885. F. C. W. Vogel, Leipzig.

(3) Léon Feltz, *Le Proteus vulgaris* Hauser; *Thèse de Pharmacie*, Paris, 1900.

sont très importantes pour arriver à de bons résultats. » Il fit également remarquer qu'il est indispensable de toujours employer une solution de violet de gentiane faite, au moment du besoin, avec de l'eau anilinée récente et que, si l'on veut utiliser le violet phéniqué, il est de même nécessaire qu'il soit fraîchement préparé.

Étant donné le soin que Feltz avait apporté à ses recherches, il semble que ses résultats auraient dû résoudre définitivement la question qui nous occupe ; pourtant il n'en est rien et, parmi les nombreux auteurs qui ont étudié le *Proteus* après lui, bien peu ont confirmé ses conclusions si catégoriques.

Je ne passerai pas en revue tous les travaux qui, depuis 1900, ont eu ce microbe pour objet et je me contenterai d'en citer trois, relativement récents. Ils sont d'ailleurs particulièrement suggestifs parce qu'ils ont été publiés presque en même temps, qu'ils ont porté sur des races isolées dans des lieux fort éloignés les uns des autres et qu'ils classent tous les trois le *Proteus* parmi les espèces ne prenant pas le Gram.

Dans le premier de ces mémoires, en juillet 1911, C. A. Herter et C. Ten Broeck (1), de New-York, indiquèrent, en effet, que les deux *Proteus* qu'ils ont examinés se décoloraient après l'action de l'iode. Dans le second, paru trois mois plus tard, E. Glaser et J. Hacla (2), de Vienne, dirent avoir étudié 16 *Proteus* d'origines très diverses et qui étaient tous Gram-négatifs. Enfin, en novembre de la même année, Ch. Cantù (3) publia les résultats de recherches entreprises à l'Institut Pasteur sur plus de 180 *Proteus* isolés par lui, dans les conditions les plus variées, et qui tous se décoloraient après traitement par la solution iodée.

Si ces divers auteurs avaient précisé la technique de leurs essais de coloration, peut-être aurais-je trouvé l'explication du désaccord qui existe entre leurs affirmations et celles de Feltz ; mais, comme aucun d'eux n'a donné les détails nécessaires, j'ai tenu à me faire une opinion personnelle en utilisant les

(1) C. A. Herter et Carl Ten Broeck, A biochemical study of *Proteus vulgaris* Hauser. *Journal of biological Chemistry*, t. IX, juillet 1911, p. 491.

(2) E. Glaser et Josef Hacla, Beiträge zur Kenntnis der Proteusbakterien... *Zeitschr. f. Immunitätsforschung*, I Original, t. XI, 14 okt. 1911, p. 310-355.

(3) Ch. Cantu, Le *Bacillus proteus*, sa distribution dans la nature. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXV, novembre 1911, p. 852.

61 *Proteus* que j'avais à ma disposition. Pour chacun de ces échantillons d'origines si diverses, j'ai fait plusieurs séries d'essais en employant des cultures en eau peptonée ou sur gélose ordinaire. L'eau peptonée était une solution à 20 p. 1000 de peptone pancréatique Defresne; la gélose était préparée avec un mélange à parties égales de bouillon de viande non peptoné et de peptone Martin.

Les préparations étaient faites avec des cultures ayant 7, 24 ou 48 heures de séjour à 37 degrés et établies en six exemplaires pour chaque série. Après dessiccation spontanée, deux d'entre elles étaient fixées par la chaleur à la manière ordinaire; deux autres étaient fixées par immersion dans une solution aqueuse saturée de sublimé, contenant 5 p. 1000 d'acide acétique, lavées à l'alcool et séchées à 37 degrés; enfin les deux dernières étaient arrosées avec un mélange à parties égales d'alcool absolu et d'éther que je laissais s'évaporer sans faire intervenir la chaleur. Ces préparations diversement fixées étaient traitées, les unes suivant l'ancienne technique — violet de gentiane aniliné fraîchement préparé, solution iodo-iodurée à 1 p. 300 d'iode, alcool absolu — les autres par la méthode généralement employée aujourd'hui — violet de gentiane phéniqué, solution iodo-iodurée au 1/300, décoloration par le mélange de Nicolle : alcool absolu 5 volumes, acétone, 1 volume. Toutes étaient alors immergées quelques instants dans la fuchsine de Ziehl diluée au 1/10 pour recolorer les éléments microbiens devenus incolores.

De plus, je n'ai jamais employé de liqueur iodo-iodurée vieille de plus de quinze jours et j'ai toujours pris soin de faire une décoloration aussi ménagée que possible. Chaque fois que j'ai utilisé l'alcool-acétone, j'ai suivi scrupuleusement les indications données par MM. Nicolle et Remlinger dans leur *Précis de Technique Microbiologique*. Je me suis donc placé dans des conditions très variées, mais, malgré cela, parmi les nombreuses races de *Proteus* que j'ai examinées, je n'en ai pas trouvé une seule qui ait pris le Gram.

Cependant je n'ai pas voulu me contenter de ce résultat et j'ai fait encore quelques essais en utilisant des milieux qui me semblaient capables d'influencer quelque peu les affinités colorantes des *Proteus* cultivés sur eux. Des cultures sur lait et sur deux milieux contenant de l'oléate de Na m'ont permis d'observer, dans des préparations traitées par l'ancienne technique, des éléments plus ou moins nombreux encore colorés en violet avec une proportion variable de microbes d'aspect granuleux; mais les *Proteus* provenant des mêmes cultures se sont toujours

complètement décolorés lorsque je les ai soumis à l'action du violet phéniqué et de l'alcool acétoné (1).

Dans certaines conditions le *Proteus* peut donc acquérir transitoirement la propriété de retenir quelque peu la matière colorante après l'action de l'iode, mais ce fait est sans grande importance en raison des circonstances exceptionnelles dans lesquelles il se produit. Il est bon de le noter cependant, car il prouve une fois de plus la réelle efficacité de l'alcool acétoné et montre bien qu'en adoptant exclusivement ce décolorant on se garantit contre les erreurs qui pourraient provenir des modifications que certains milieux apportent aux affinités colorantes des microbes.

Enfin, il est un dernier point qu'il m'a fallu élucider, c'est celui qui résulte de l'imprécision dans laquelle Feltz a laissé ses lecteurs quant à la nature du décolorant qu'il a utilisé. Il dit simplement qu'il a toujours fait le «Gram-Weigert» en colorant avec du violet de gentiane aniliné, mais il ne parle pas des opérations consécutives; or, si l'on se rapporte aux ouvrages de technique, comme ceux de Besson (2) ou de Rudolf Abel (3), on voit que la méthode de Gram modifiée par Weigert comporte, avec l'emploi du violet aniliné, une décoloration par l'huile d'aniline pure. Il me fallait donc rechercher si ce procédé appliqué intégralement ne me donnerait pas des résultats différents de ceux que j'ai utilisés.

C'est ce que j'ai fait pour quelques *Proteus* pris au hasard parmi mes soixante et une races. Je les ai utilisés en cultures de 18 heures et je les ai traités suivant Weigert, avec des réactifs fraîchement préparés; malgré cela j'ai constaté qu'ils se comportaient tous de la même façon qu'avec l'alcool absolu et l'alcool-acétone.

En résumé, il résulte de mes recherches que le *Proteus vulgaris* Hauser ne prend pas le Gram, lorsqu'il provient de cultures en milieux usuels et qu'il est traité par la méthode de Gram-Nicolle. La diversité des races que j'ai étudiées ainsi que la multiplicité de mes essais me donnent,

(1) A. Berthelot, Recherches sur quelques caractères du *Proteus vulgaris*; *Thèse de Médecine*, Paris, 1913, p. 8.

(2) A. Besson, *Technique microbiologique et sérothérapique*, 5e éd., Paris, 1911.

(3) R. Abel, *Bakteriologisches Taschenbuch*, 10e éd., Würzburg, 1906, p. 46.

il me semble, le droit de conclure d'une façon aussi formelle.

II. — Action du proteus sur les hydrates de carbone.

Bien que le mode d'action sur les sucres constitue un des meilleurs caractères différentiels des espèces microbiennes, de nombreux ouvrages classiques sont muets sur ce point en ce qui concerne le *Proteus vulgaris*. Cette omission est d'autant plus regrettable qu'il s'agit d'un microbe très répandu dans la nature, tantôt saprophyte, tantôt pathogène et pouvant peut-être donner lieu à des races très voisines, ne se distinguant que par quelques caractères biochimiques.

A vrai dire, la négligence des auteurs de ces ouvrages est peut-être voulue et elle a sans doute pour raison l'incertitude dans laquelle nous laissent les travaux des bactériologistes qui ont étudié les propriétés saccharolytiques du *Proteus*.

En effet, parmi ceux-ci, les uns comme Leiborius (1), Gaillard (2), Théobald Smith (3), Herter et Ten Broeck (4), sont d'accord pour affirmer que ce microbe, quelle que soit son origine, attaque toujours le glucose et le saccharose, mais laisse intact le lactose, tandis que d'autres comme Cantù (5) ont une opinion un peu différente.

Pour ce dernier « les sucres sont attaqués par tous les *Proteus*. Avec le lactose seulement, l'attaque n'est pas constante avec toutes les races et avec un même *Proteus* ».

« Les races isolées des viandes et, en général, des substances animales pourries, attaquent les sucres avec une violence qu'on ne retrouve pas dans les cultures de *Proteus* isolées des végétaux : cette différence est vraie des premières cultures ; elle s'efface quand les *Proteus* ont été réensemencés plusieurs fois et s'éloignent pour ainsi dire des conditions naturelles. »

Il est assez difficile de se faire une idée de la valeur respec-

(1) Leiborius, in *die Mikroorganismen* de Flügge, 1896.

(2) Gaillard, *Contribution à l'étude chimique du Groupe Proteus*, Thèse de Médecine, Paris, 1897.

(3) Theobald Smith, Modifications temporary and permanent of the physiological characters of bacteria in mixed cultures. *Trans. Ass. of Amer. Phys.*, IX, 1894, p. 567-599.

(4) Herter et Ten Broeck, *loc. cit.*

(5) Ch. Cantu, *loc. cit.*

tive des conclusions de ces divers auteurs, car elles résultent de recherches faites dans des conditions pas trop dissemblables. C'est ainsi que Gaillard et Herter ont étudié un très petit nombre de races, alors que Cantù a examiné 184 *Proteus* d'origines extrêmement variées. D'autre part, les auteurs que je viens de citer ne précisent guère, dans leurs mémoires, la composition des milieux qu'ils ont utilisés et ne donnent que fort peu de détails sur la technique qu'ils ont suivie.

Comme j'avais la chance de disposer d'un grand nombre de *Proteus*, j'ai tenu à étudier, à mon tour, l'action de ce microbe sur les hydrates de carbone, non seulement dans le but de préciser quelque peu la valeur d'un caractère important, mais aussi pour être en mesure de mieux comparer les échantillons isolés des diarrhées infantiles avec ceux qui provenaient d'autres origines.

Afin de pouvoir examiner toutes les races que je possédais j'ai dû m'en tenir, comme Cantù, à une méthode de recherches simple et d'application rapide ; je me suis efforcé toutefois d'éviter les causes d'erreurs dont il ne semble pas s'être inquiété. Il est regrettable que le nombre d'essais à entreprendre m'ait forcé d'utiliser des procédés purement qualitatifs ; mais, fort heureusement, l'infériorité des résultats que ceux-ci m'ont donnés est largement compensée, il me semble, par la grande diversité d'origine des *Proteus* que j'ai étudiés.

Comme milieu de culture j'ai utilisé la solution suivante :

Eau	1.000
Peptone pancréatique Defresne sèche, en paillettes .	20

A l'aide de microbes dont je connaissais parfaitement les propriétés biochimiques je m'étais assuré au préalable que l'échantillon de peptone qui devait me servir pour toutes mes expériences ne renfermait pas de substances hydrocarbonées pouvant donner lieu à la production d'acides. Pour neutraliser l'eau peptonée je l'additionnais d'un excès de carbonate de calcium pur précipité et je la portais à l'ébullition pendant quelques minutes ; je laissais le carbonate se déposer et le décantais sur un filtre. Le liquide filtré, neutre au tournesol et à peine coloré, était alors réparti dans des tubes à essais, dans lesquels on en versait uniformément 10 cent. cubes, puis stérilisé 20 minutes à 120 degrés.

D'autre part, je préparais des solutions concentrées des diverses substances parfaitement pures sur lesquelles je voulais faire agir le *Proteus*, solutions qui étaient stérilisées soit à 120 degrés, soit à froid (lévulose) par filtration sur bougie Chamberland. Pour chaque expérience, j'ajoutais aseptiquement

dans une série de tubes d'eau peptonée un volume de solution sucrée calculé de telle façon que le milieu de culture contînt environ 3 p. 100 de l'hydrate de carbone considéré; je plaçais alors tous ces tubes à l'étuve à 37 degrés Vingt-quatre heures après je m'assurais qu'aucun d'eux n'avait cultivé et je pratiquais l'ensemencement avec une race de *Proteus* provenant d'une culture de 24 heures sur gélose ordinaire. Les milieux sucrés ainsi ensemencés étaient mis à 37 degrés en même temps qu'un nombre égal de tubes d'eau peptonée ensemencés avec les mêmes *Proteus*.

Après un temps convenable de séjour à l'étuve, je versais dans tous les tubes le même volume d'une teinture de tournesol sensible et je notais la réaction présentée par les diverses cultures en eau peptonée et en milieu sucré.

Mes essais ont porté sur le glucose, le galactose, le lévulose, le maltose, le saccharose, le lactose et la mannite; mais, comme le *Proteus* est avant tout un fort producteur d'ammoniaque, je ne me suis pas contenté d'un seul essai et j'ai examiné successivement des cultures de deux, cinq, dix et quinze jours. Voici les résultats que j'ai obtenus :

Avec le glucose et le galactose toutes les cultures de cinq, dix et quinze jours étaient acides, tandis qu'elles étaient toutes alcalines avec le lactose et la mannite. Je dois dire cependant qu'un certain nombre de cultures de deux jours sur glucose ou galactose étaient neutres, mais le cinquième jour elles étaient toutes devenues acides. Avec le saccharose, au bout de deux jours, certaines cultures accusaient une réaction acide, tandis que d'autres étaient neutres ou faiblement alcalines; les cultures de cinq jours étaient presque toutes acides, mais quelques-unes étaient neutres; enfin les cultures de dix et quinze jours étaient nettement acides.

Les cultures sur lévulose et maltose se comportaient, au début, à peu près comme celles sur saccharose; les unes étaient acides, les autres neutres ou alcalines : mais le nombre de ces dernières ne diminuait pas, même au bout de 10 ou 15 jours.

De l'ensemble de ces constatations il faut donc retenir que toutes les races de *Proteus vulgaris, quelle que soit leur origine* (1), acidifient au bout de *dix jours à* 37 *degrés* les milieux renfermant du glucose, du galactose ou du saccharose comme

(1) A ce propos je dois faire observer que, pour éviter autant que possible l'influence de toute variation individuelle, je n'ai utilisé pour mes essais que des *Proteus* isolés depuis au moins deux mois et ayant subi de nombreux passages sur les milieux usuels.

unique aliment hydrocarboné, mais laissent neutres ou alcalins ceux qui contiennent du lactose ou de la mannite.

D'autre part, il est important de remarquer que la grande variabilité des pouvoirs alcaligène et acidogène impose de ne tenir compte que des changements de réaction constatés sur des cultures assez âgées. Pour certains *Proteus* en effet, la production d'ammoniaque est extrêmement précoce et intense, alors que la formation d'acides aux dépens des hydrates de carbone est assez lente; on comprend facilement que, dans ces conditions, une observation trop hâtive donnerait un résultat inexact.

Ainsi qu'on peut s'en rendre compte par les faits rapportés plus haut, il suffit généralement, pour éliminer cette cause d'erreur, de n'examiner les cultures qu'au bout de 10 jours.

Pour ce qui concerne le lévulose et le maltose, si l'on avait affaire à une autre espèce qu'au *Proteus*, on pourrait conclure à l'existence de deux sortes de races caractérisées par leur différence d'action sur ces deux sucres. Mais avec un microbe comme celui qui nous occupe, il serait singulièrement imprudent d'adopter de telles conclusions; l'exemple du saccharose est là pour montrer que, dans des essais de cette sorte, basés simplement sur l'observation de la réaction finale, il ne faut pas oublier que celle-ci résulte du balancement des deux actions principales qui se manifestent simultanément dans les cultures : 1° attaque de l'aliment azoté avec formation d'ammoniaque; 2° attaque éventuelle de l'aliment hydrocarboné avec formation d'acides.

Tous les *Proteus* donnent peut-être des acides aux dépens du lévulose ou du maltose et il est possible que la diversité des résultats que j'ai obtenus à cet égard tienne simplement à des différences d'intensité du pouvoir alcaligène et de l'action saccharolytique des diverses races.

On pourra facilement m'objecter que je n'aurais pas dû laisser persister un tel doute sur un point aussi important. A cela je répondrai qu'il m'était pratiquement impossible d'examiner l'action de 61 *Proteus* sur sept substances avec des méthodes comportant des déterminations quantitatives.

Les résultats que m'ont donnés mes essais avec le glucose, le galactose, le saccharose, le lactose et la mannite sont assez constants, il me semble, pour aider à l'identification du *Proteus*

vulgaris, d'autant mieux qu'ils confirment pour le glucose, le saccharose et le lactose les constatations des auteurs qui ont étudié quelques races avec des méthodes plus précises. Toutefois, ces résultats ayant été obtenus à l'aide d'un procédé purement qualitatif, je les considère simplement comme des renseignements utiles et je leur refuse toute valeur intrinsèque permettant de les utiliser à la distinction éventuelle de plusieurs races dans l'espèce créée par Hauser. A ce point de vue, seuls des dosages pourront fournir les données nécessaires.

III. — Le proteus considéré comme producteur de phénol et d'indol.

A. — Recherche du phénol et du p. crésol.

En 1890, Lewandowsky (1) publia que les cultures de *Proteus vulgaris* en bouillon de viande contiennent à la fois du phénol et de l'indol. La plupart des auteurs qui étudièrent ce microbe après lui s'inquiétèrent peu du premier de ces corps et s'intéressèrent surtout au second, qu'ils considéraient comme beaucoup plus facile à déceler. Toutefois Tissier et Martelly (2), en 1902, puis Dobrowolsky (3), en 1908, examinèrent à nouveau le *Proteus* au point de vue de la production de phénol. Les deux premiers auteurs étudièrent un *Proteus vulgaris* isolé d'une putréfaction de viande et ils confirmèrent les résultats de Lewandowsky.

Dobrowolsky utilisa pour ses recherches deux races dont il ne précise pas l'origine et qu'il cultiva sur bouillon additionné de 20 p. 1000 de peptone et d'un excès de carbonate de calcium. Il analysa ses cultures au bout de 48 heures et, dans le distillat qu'elles lui fournirent, il trouva seulement des traces de phénol. Des dosages exécutés avec des cultures de 10 jours lui indiquèrent la présence de moins de 1 milligramme de phénol *par litre* pour l'un des échantillons, et de 3 milligrammes pour

(1) Lewandowsky, Ueber Indol und Phenolbildung durch Bakterien. *Deutsche med. Wochenschrift*, 1890, n° 51, p. 1186.

(2) H. Tissier et Martelly, Recherches sur la putréfaction de la viande de boucherie. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1902, p. 865.

(3) Dobrowolsky, Des microbes producteurs de phénol. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1910, n° 7, p. 595.

l'autre. Il résulte donc des travaux de cet auteur que la production de phénol par le *Proteus vulgaris* est pratiquement sans importance.

Plus récemment Herter et Ten Broeck (1) recherchèrent aussi le phénol dans les cultures de deux races de *Proteus vulgaris*, mais ils n'en trouvèrent point, pas plus dans celles en bouillon peptoné que dans d'autres sur bouillon additionné de 0,2 p. 1.000 de tyrosine.

Enfin, pour ma part, je viens d'obtenir des résultats qui concordent absolument avec ceux de ces deux derniers auteurs. Dans un premier essai sur bouillon de viande peptoné additionné de CO^3Ca, aucun de mes *Proteus* ne m'a donné de phénol ; mais je ne m'en suis pas tenu là, car j'ai voulu, comme Herter, me placer dans de meilleures conditions de culture.

Ne pouvant naturellement effectuer ces nouvelles recherches sur 61 échantillons, j'ai pris au hasard, parmi eux, 5 *Proteus* de diarrhées infantiles (Paris et Londres), et 5 autres d'origines diverses (putréfaction, otites, vomique, collection de l'Institut Pasteur). Je les ai ensemencés dans une solution d'une peptone pancréatique riche en tyrosine libre et dans un liquide nutritif chimiquement défini contenant des acides aminés et notamment une forte proportion de tyrosine (2); avec aucun de ces deux milieux, je n'ai pu déceler trace de phénol ou de crésol dans le distillat de cultures âgées de 4, 8 et 15 jours.

En somme, *dans les conditions variées où je me suis placé*, le *Proteus vulgaris* Hauser n'est pas un producteur de phénol.

B. — Étude de la fonction indologène.

Ainsi que je le disais au début de ce chapitre, les bactériologistes qui ont étudié le *Proteus vulgaris* ont généralement négligé la recherche du phénol dans les cultures de ce microbe. Par contre, toute leur attention s'est portée sur l'indol et, depuis Lewandowsky, ils ont toujours considéré la faculté de produire cette substance comme l'un des plus importants caractères du

(1) Herter et Ten Broeck, *loc. cit.*
(2) A. Berthelot, Recherches sur quelques caractères du *Proteus vulgaris*, *loc. cit.*, p. 16-17.

microbe de Hauser. En 1900, Feltz (1) étudia même assez complètement ce point de la biochimie du *Proteus*. Il eut l'heureuse idée de tenir compte des indications de Grimbert (2) sur la variabilité de composition des peptones et il montra qu'une même race de *Proteus* peut produire de l'indol aux dépens de certaines de ces préparations et ne pas en donner avec d'autres. Ses recherches, qui portèrent sur 4 échantillons, furent donc faites dans de meilleures conditions que celles de ses devanciers ; elles aboutirent à cette conclusion que le *Proteus vulgaris* se comporte toujours en producteur d'indol lorsqu'on le cultive dans un milieu préparé avec une peptone convenablement choisie.

Deux ans plus tard, Tissier et Martelly examinèrent un *Proteus* isolé de viande en putréfaction ; ils trouvèrent qu'il produisait de l'indol même dans les cultures sur bouillie de viande.

La constance du caractère biochimique qui nous occupe semblait assez bien établie lorsqu'en 1906, F. A. Steensma (3) remarqua que le distillat des cultures de certaines races de *Proteus* ne contenait pas d'indol, alors que les cultures mêmes prenaient une coloration rose par addition de nitrite de potassium et d'acide sulfurique.

On ne prêta guère attention à ces faits pourtant intéressants et 5 ans après, Herter et Ten Broeck n'en tinrent aucun compte quand, après avoir examiné seulement deux races, ils publièrent que le *Proteus* cultivé dans une solution de peptone de Witte (1 p. 100) et d'extrait de viande Liebig (0,4 p. 100) produit un peu d'indol et une quantité notable d'acide indolacétique.

Dans un travail paru à peu près à la même époque que celui de Herter, Cantù considère ce microbe comme un producteur d'indol et, bien qu'il en ait étudié plus de 180 échantillons, il ne dit pas en avoir trouvé qui n'ait pas ce caractère.

En 1912, Louis Gauthier (4), se basant sur l'examen de deux

(1) Feltz, *loc. cit.*

(2) L. Grimbert, De l'unification des méthodes de culture en bactériologie. *Archives de Parasitologie*, t. I, n° 2, p. 191, 1898.

(3) Steensma, Ueber den Nachweis von Indol ... in Bakterienkulturen. *Centralbl. f. Bakteriologie*, Originale, mai 1906, t. XLI, p. 215.

(4) Louis Gauthier, Recherches sur l'indol en microbiologie. *Thèse de Pharmacie*, Lyon, 1912.

races, publia que les cultures de *Proteus* dans une solution de peptone pancréatique contiennent toujours de l'indol au bout de 12 heures.

Enfin, quelques mois plus tard, J. J. van Loghem et J. C. W. van Loghem-Pouw (1), après avoir étudié 30 échantillons, confirmèrent les résultats obtenus par Steensma et crurent bien faire de considérer comme représentants d'une espèce à part, *Bacillus proteus anindologenes*, les *Proteus vulgaris* ne donnant pas d'indol.

En présence d'une telle confusion il m'a semblé utile de déterminer, d'une manière aussi précise que possible, quelle est la valeur réelle de la fonction indologène en tant que caractère spécifique du *Proteus vulgaris*. Pour cela, j'ai fait porter mes recherches sur les 61 *Proteus* dont je disposais.

Avant d'exposer le détail de mes expériences, je crois bon d'insister quelque peu sur les procédés que j'ai employés pour déceler la présence de l'indol dans les cultures microbiennes.

Jusqu'à ces dernières années, pour caractériser cette substance, les bactériologistes utilisaient généralement une réaction basée sur la formation de nitroso-indol. Cette réaction se pratique le plus souvent suivant la technique adoptée par Kitasato (2) lors de ses premières recherches sur les microbes indologènes, c'est-à-dire qu'à 10 cent. cubes d'une culture en bouillon ou en eau peptonée on ajoute 1 cent. cube d'une solution aqueuse de nitrite de sodium ou de potassium à 0,2 p. 1000, puis quelques gouttes d'acide chlorhydrique à 22° B^{é} ou d'acide sulfurique à 66° B^{é}. Une coloration rouge ou rose indique la présence d'indol ; la sensibilité de la réaction peut être accrue en rassemblant dans l'alcool amylique le nitroso-indol formé.

Bien que ce procédé de recherche soit encore employé très fréquemment, depuis 1901, on tend de plus en plus à lui substituer la réaction d'Ehrlich au p. diméthylaminobenzaldéhyde

(1) J. J. Van Loghem et J. C. W. Van Loghem-Pouw, Beitrag zur Differenzierung der Proteus-Gruppe. *Centralbl. f. Bakteriologie.* Originale, t. LXVI, 24 août 1912.

(2) Kitasato, Die negative Indol-Reaktion der Typhusbazillen im Gegensatz zu anderen ähnlichen Bazillenarten. *Zeitschr. f. Hygiene*, t. VII, 1889, p. 515.

qui est d'une extrême sensibilité (1). Dans les laboratoires de bactériologie on l'effectue généralement en ajoutant à 10 cent. cubes d'une culture, en bouillon ou en eau peptonée, quelques centimètres cubes d'une solution alcoolique de diméthylaminobenzaldéhyde à 2 p. 100, puis avec précaution quelques gouttes d'acide chlorhydrique ou d'acide sulfurique concentré. Certains expérimentateurs croient utile d'ajouter un persulfate ou un nitrite alcalin ou de faire la réaction à chaud.

Bien d'autres réactions permettent, comme on le sait, de caractériser l'indol, mais je ne m'en occuperai point ici, car leur emploi est rarement utile dans le cas qui nous occupe. Je préfère m'en tenir aux deux que je viens de citer et montrer combien la valeur des résultats qu'elles fournissent dépend des conditions dans lesquelles elles sont effectuées.

Pendant longtemps on s'est contenté d'ajouter directement aux cultures du nitrite de sodium et de l'acide; puis, pour déceler les très petites quantités d'indol, on eut l'idée de caractériser ce composé non plus dans les cultures mêmes, mais dans leur distillat. Cette manière de faire avait en même temps l'avantage de supprimer une importante cause d'erreur, surtout avec les réactifs modernes; avec elle on évitait de pratiquer la recherche de l'indol en présence de certaines substances qui existent dans les cultures et qui peuvent donner lieu à des colorations gênantes. De nombreux auteurs, et notamment Steensma, montrèrent l'intérêt qu'il y avait de préférer à toute autre technique la distillation des cultures; pourtant celle-ci ne méritait guère, ainsi que nous allons le voir, la confiance qu'ils lui accordaient.

Porcher et Panisset (2) ont établi, en effet, que dans les cultures microbiennes, même d'espèces ne donnant pas d'indol, peuvent se former certaines substances, qui ont comme caractère commun de se décomposer facilement en donnant de

(1) Ehrlich, Ueber die Dimethylaminobenzaldehyd-Reaktion, *Deutsche med. Wochenschrift*, 1901, n° 15.

(2) Ch. Porcher, Des corps indologènes dans l'urine, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 3 mai 1909.

Ch. Porcher et L. Panisset, Recherche de l'indol dans les bouillons microbiens, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 24 août 1909. Des composés indologènes dans les cultures liquides, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 17 mai 1909.

l'indol ; or l'une d'elles, l'acide indolcarbonique, se dissocie même lorsqu'on porte simplement sa solution aqueuse à l'ébullition. La présence de tels composés indologènes rend donc illusoire la précaution que l'on prenait de distiller les cultures et, pour extraire l'indol qui peut se trouver dans celles-ci, il apparaît indispensable d'avoir recours à d'autres procédés qu'à l'entraînement par la vapeur d'eau. Celui qui convient le mieux est certainement l'épuisement des liquides à analyser par l'éther convenablement purifié.

Porcher et Panisset ont donc eu le mérite de révéler une grave cause d'erreur dans l'étude de la fonction indologène des microbes et de rappeler en même temps aux bactériologistes qu'on ne doit jamais caractériser directement un corps dans une culture microbienne. Malheureusement leurs conseils n'ont pas été suivis comme ils le méritaient, à tel point que les résultats obtenus par Steensma, en 1906, sont sûrement plus près de la vérité que ceux publiés dans nombre de travaux récents.

En effet, certains auteurs, ennemis de ce qu'ils appellent dédaigneusement des complications, considèrent comme très suffisant de rechercher l'indol en pratiquant la réaction d'Ehrlich directement dans les cultures. Pas plus qu'ils ne s'inquiètent des recommandations de Porcher et de Gauthier, ils ne tiennent aucun compte des travaux des nombreux chimistes (1) qui ont montré que le diméthylaminobenzaldéhyde donne avec diverses substances, existant normalement dans la plupart des cultures microbiennes et même dans certains milieux stériles, des colorations très difficiles à distinguer de celles que produisent l'indol et le scatol.

Il n'est d'ailleurs pas besoin de connaître les travaux que je viens de signaler, pour se rendre compte des précautions

(1) Steensma, Uber Farbenreaktionen der Eiweisskörper... mit aromatischen Aldehyden und Nitriten, *Zeitschr. f. Physiol. Chemie*, t. XLVII, p. 25.

Steensma, Die Farbenreaktionen in der Biochemie, *Biochem. Zeitschr.*, t. VIII, p. 203, 1908.

Fleig, Réactions colorées du tryptophane, de l'indol, du pyrrol, etc... avec les aldéhydes aromatiques, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, juillet 1908.

Cl. Gautier, Réactions de la phloroglucine et de l'orcéine avec le p. diméthylaminobenzaldéhyde..., *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 23 mai 1908.

Rhode, Die Farbenreaktionen der Eiweisskörper mit *p.*-dimethylaminobenzaldehyd..., *Zeitschr. f. Physiol. Chemie*, t. XLIV, 1905, p. 161.

qu'impose l'usage du diméthylaminobenzaldéhyde ; il suffit de se conduire en expérimentateur consciencieux et de ne pas adopter un réactif aussi sensible sans avoir vu ce qu'il donne avec des milieux témoins. Si les auteurs dont je parle plus haut avaient pris ce soin, ils auraient vu que certains milieux usuels et les solutions de certaines peptones, stériles ou ensemencés avec des microbes non producteurs d'indol, donnent, lorsqu'on les traite directement avec le réactif d'Ehrlich, des colorations très variées allant du bleu au rouge groseille en passant par toutes les teintes du violet. Je veux croire qu'en présence de constatations de cette sorte, ils n'auraient pas adopté une telle manière de procéder et auraient cherché un moyen d'éviter des causes d'erreur aussi évidentes. Il faut croire toutefois que la nécessité des témoins et des expériences à blanc n'est pas encore admise par tout le monde, car j'ai eu maintes fois l'occasion de voir employer le procéder simpliste dont, après tant d'autres, je viens de montrer les inconvénients (1).

Quoi qu'il en soit, l'exemple est assez curieux des mauvais résultats que peut donner, lorsqu'elle est utilisée sans précaution, une méthode excellente et très sensible. Il est pourtant bien facile ainsi qu'on le verra plus loin, d'appliquer correctement la réaction d'Ehrlich et d'en obtenir des résultats ne prêtant guère à discussion. Bien entendu toutes les réserves que je viens de faire ne s'appliquent qu'aux travaux récents et, pour identifier des microbes appartenant à des espèces décrites depuis longtemps comme producteurs d'indol, il faudra toujours se servir du procédé au nitrite tels que l'utilisaient les anciens auteurs, quitte à compléter ou corriger leurs observations en faisant des témoins et en employant des méthodes plus rigoureuses.

Enfin, étant donné ce que l'on sait sur l'origine de l'indol qui se forme dans certaines cultures microbiennes, on conçoit sans peine que les microbes capables d'attaquer le tryptophane, de

(1) On trouvera dans un travail de H. Seidelin et Fr. Lewis (Some notes on indole-reaction and allied phenomena, *Journal of Hygiene*, décembre 1911, p. 504) un exemple des pertes de temps, des incertitudes et des difficultés d'interprétation auxquelles expose la méconnaissance des faits révélés par Neubauer, Cole, Rhode, Porcher, Steensma et Gauthier.

quelque manière que ce soit, manifesteront beaucoup mieux leur action lorsqu'ils se trouvent directement en présence de cet acide aminé libre et qu'ils n'auront pas à le séparer d'un édifice moléculaire le plus souvent très complexe.

Comme l'on sait que le meilleur procédé de préparation du tryptophane consiste dans la digestion tryptique, aseptique et prolongée, de matières albuminoïdes convenablement choisies, on doit donc, pour préparer les milieux destinés à l'étude de la fonction indologène, donner la préférence aux « peptones pancréatiques », particulièrement à celles de caséine. Toutefois, il vaut encore mieux, comme je vais le montrer, employer des milieux de composition bien définie auxquels on incorpore du tryptophane.

J'ai déjà rapporté sommairement les résultats que j'avais obtenus en examinant 57 races de *Proteus vulgaris* au point de vue de leur fonction indologène (1); je vais maintenant les exposer plus complètement, tels que je les ai confirmés par l'étude de quatre autres échantillons, en précisant autant que possible les conditions dans lesquelles mes recherches ont été réalisées.

J'ai d'abord ensemencé tous mes *Proteus* dans de l'eau peptonée à 20 p. 1.000. Celle-ci était préparée avec une peptone commerciale obtenue par digestion tryptique de la viande et donnant nettement avec l'eau de brome la réaction du tryptophane; comme l'extrait éthéré de cette même peptone donnait une légère coloration rose avec le réactif d'Ehrlich, je prenais la précaution, indiquée par Porcher, de réduire au cinquième de son volume, par une vive ébullition à l'air libre, la solution à 20 p. 1.000. Après avoir rétabli, par addition d'eau distillée, le volume primitif de celle-ci, je la neutralisais par la soude; j'avais ainsi une eau peptonée débarrassée des traces d'indol décelables par le diméthylaminobenzaldéhyde. J'ai donc cultivé sur ce milieu les 61 *Proteus* dont je disposais et, après 24 heures de séjour à 37 degrés, j'ai recherché l'indol dans les cultures par le procédé suivant (2) :

1° Opérer sur 10 à 15 cent. cubes de culture; prendre la réaction de

(1) Albert Berthelot, Recherches sur quelques caractères spécifiques du *Proteus vulgaris*. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 15 mars 1913, t. LXXIV, p. 575.

Albert Berthelot, Recherches sur le *Proteus vulgaris* considéré comme producteur d'indol. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 24 février 1913, t. CLVI, p. 641.

(2) Ce procédé ne diffère de celui de Porcher et Panisset que par l'alcalinisation préalable de la culture, alcalinisation ayant surtout pour but, dans le cas du *Proteus* d'empêcher l'entraînement de l'acide indolacétique par l'éther (Sur la recherche de l'indol dans les milieux liquides des cultures, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1911, t. LXX, p. 369 et 371).

celle-ci au papier de tournesol et, si besoin est, l'additionner de quelques gouttes de lessive de soude pour *l'alcaliniser franchement.*

2° Ajouter à la culture contenue dans un tube à essai son volume d'éther purifié spécialement (1); agiter doucement pendant quelques minutes, puis laisser déposer jusqu'à ce que la couche éthérée soit bien limpide, au moins dans la moitié supérieure de sa hauteur — dans le cas d'une émulsion par trop stable, disloquer celle-ci par addition de quelques gouttes d'alcool.

3° Avec un tube à effilure courte dont on se sert à la manière d'un tâtevin, prélever en s'y reprenant à plusieurs reprises, quelques centimètres cubes de la solution éthérée, en prenant bien garde de n'entraîner aucune gouttelette du milieu de culture (2).

4° Aux 3 ou 4 cent. cubes d'éther ainsi recueillis dans un tube à essai, ajouter le quart de leur volume d'une solution de diméthylaminobenzaldéhyde à 4 p. 100, dans l'alcool à 96 degrés; agiter pour bien mélanger les deux liqueurs.

5° A l'aide d'un tube effilé faire arriver lentement au fond du tube renfermant le mélange solution éthérée + réactif, 2 ou 3 cent. cubes d'acide chlorhydrique. Laisser reposer cinq minutes; examiner alors le tube devant un fond blanc. La présence d'indol dans la culture examinée est caractérisée par l'apparition d'un anneau rouge légèrement violacé dans la zone de contact des deux liqueurs; lorsque la proportion d'indol est assez forte, la coloration s'étend à toute la couche inférieure. Une teinte plus violacée, une tendance vers le bleu s'accusant avec le temps est l'indice de la présence de scatol (3) ou tout au moins d'un mélange de ce corps avec l'indol; bien entendu, dans ce cas, on ne doit pas s'en tenir à cette simple coloration et il faut utiliser des réactions différentielles plus nettes, qui sont fort bien exposées dans la thèse d'Hervieux.

Le procédé que je viens de décrire est moins rationnel que celui de L. Gauthier, mais, ainsi que je l'ai maintes fois vérifié, il fournit des résultats *qualitatifs* tout aussi exacts. Son seul point délicat réside dans la séparation de la solution éthérée, bien que, lorsqu'on opère avec soin, il soit impossible d'entraîner des gouttelettes aqueuses avec l'éther.

Il est d'ailleurs très simple de se mettre à l'abri de toute cause d'erreur de cette sorte en agitant doucement, dans un tube étroit, les quelques centimètres cubes de liqueur éthérée avec leur volume d'eau légèrement alcalinisée par la soude; en laissant reposer pendant quelques instants il est alors facile de puiser avec une pipette effilée une quantité suffisante de solution éthérée totalement exempte d'impuretés, capable de donner une coloration avec le réactif d'Ehrlich. Même en prenant l'excès de précautions que je viens d'indiquer il ne m'a jamais fallu plus de dix minutes pour rechercher l'indol dans une culture.

(1) Sur la nécessité et la technique de cette purification voir la thèse de Louis Gauthier (page 20); pour purifier l'éther je me contente ordinairement de le laver avec le tiers de son volume d'une solution de soude à 5 p. 100, puis, à deux reprises avec de l'eau distillée.

(2) Quand on opère sur un petit volume de culture il est très commode, ainsi que mon regretté collègue M. D. M. Bertrand en a eu l'idée, d'employer une pipette de Wright à tétine de caoutchouc.

(3) Avec le scatol seul la teinte primitivement violette devient complètement bleue en trente minutes.

J'ai donc examiné avec cette méthode les cultures de 24 heures de mes *Proteus*, sur peptone pancréatique de viande, et j'ai constaté que seulement vingt-quatre d'entre elles contenaient de l'indol. En présence de ce résultat j'ai ensemencé les échantillons qui ne donnaient pas d'indol dans plusieurs séries de tubes du même milieu et j'ai analysé les cultures après 2, 4 et 8 jours d'étuve ; cette fois encore je n'ai pu trouver trace d'indol.

Mais dès le deuxième jour, les cultures de sept de ces *Proteus* non producteurs d'indol, ont pris une teinte rose lorsque j'y ai ajouté les proportions habituelles de nitrite de potassium et d'acide chlorhydrique, alors que toutes les autres restaient incolores. Les résultats obtenus par Herter ayant attiré mon attention sur la présence possible d'acide indolacétique, je n'ai pas été, comme Steensma, intrigué par la réaction colorée que me présentaient ces cultures et j'y ai cherché cette substance.

Pour cela j'ai immédiatement ensemencé chacun des *Proteus* non indologènes dans 750 cent. cubes d'eau peptonée et, au bout de 48 heures, sur 50 cent. cubes des diverses cultures, j'ai répété l'essai avec le nitrite. En même temps j'effectuais celle-ci avec de l'eau peptonée additionnée d'une part de traces d'indol, d'autre part de traces d'acide indolacétique. J'ai remarqué immédiatement que les cultures de *Proteus* et l'eau peptonée chargée d'acide indolacétique, prenaient une teinte rosée légèrement violacée, peu accusée, tandis que l'eau peptonée chargée d'indol se colorait nettement en rouge. Dans toutes ces liqueurs j'ai extrait la substance colorante avec le même volume d'alcool amylique. Les différences de coloration se sont encore accusées ; j'ai alors dilué avec de l'alcool amylique les solutions trop foncées, de manière à les amener à peu près à la même intensité colorante et je les ai examinées au spectroscope.

J'ai constaté que les solutions amyliques provenant de cultures de *Proteus* non indologènes et d'eau peptonée chargée d'acide indolacétique donnaient, pour une même épaisseur, un spectre caractérisé par une bande d'absorption dans le vert, bien accusée entre les longueurs d'onde $\lambda = 560$ et $\lambda = 530$, se dégradant vers le jaune jusqu'à $\lambda = 575$ et vers le bleu jusqu'à $\lambda = 515$, tandis que la solution amylique de nitrosoindol absorbait le vert, le bleu, l'indigo et le violet du spectre à partir de la longueur d'onde $\lambda = 565$, l'absorption commençant même au voisinage de $\lambda = 582$.

Par l'examen spectroscopique il semblait donc bien probable que les *Proteus* qui donnaient une réaction colorée avec le nitrite, étaient simplement des producteurs d'acide indolacétique. Je m'en suis assuré de la façon suivante : Les 700 cent. cubes de culture qui me restaient après l'épreuve spectroscopique ont été *légèrement acidifiés* par l'acide sulfurique et épuisés par l'éther dans une boule à décantation : la liqueur éthérée (500 cent. cubes environ) a été réduite au cinquième par distillation et agitée avec la moitié

de son volume (50 cent. cubes environ) d'eau faiblement alcalinisée par la soude. La liqueur aqueuse décantée, additionnée d'acide chlorhydrique jusqu'à très faible réaction acide, a été maintenue quelques instants à 45 degrés pour chasser l'éther dissous.

De petites portions des liqueurs aqueuses ainsi obtenues pour les 7 *Proteus*, ont alors été examinées en même temps qu'une solution aqueuse d'acide indol-3-acétique à 1 p. 1.000; toutes m'ont donné un résultat positif avec les réactions considérées par Salkowsky et Herter (1) comme caractéristiques :

1° Avec HCl et NO^2K production d'une coloration rose passant complètement dans l'alcool amylique et donnant une bande d'absorption dans le vert.

2° Avec HCl et *traces* de Fe^2Cl^6 production d'une coloration voisine du rouge cerise.

J'ai alors épuisé par l'éther le reste des solutions légèrement acides, dont j'avais utilisé une très faible partie pour les réactions ci-dessus, et j'ai concentré par distillation les liqueurs éthérées résultant de cet épuisement. J'ai versé le résidu de ces distillations dans des petits ballons à fond rond et j'ai chassé le reste d'éther en les maintenant à 60 degrés. A ce moment j'ai placé les ballons sur un bain de sable que j'ai maintenu à 110-115 degrés pour chasser l'eau que l'évaporation avait laissée, puis j'ai élevé la température à 210 degrés, mais en ayant soin de ne chauffer que le fond des ballons, c'est-à-dire la partie sur laquelle existait un léger résidu. Après 10 minutes de chauffage, j'ai laissé refroidir les ballons et j'ai repris par quelques centimètres cubes d'alcool le léger enduit qui se trouvait sur leurs parois; j'ai traité la solution alcoolique ainsi obtenue par le réactif d'Ehrlich et l'acide chlorhydrique. Toutes contenaient du scatol car elles m'ont donné une coloration violacée d'abord peu accentuée, mais qui a foncé rapidement et s'est changée assez vite en une teinte bleue, présentant un spectre d'absorption parfaitement caractéristique. L'existence de ce scatol, qui se forme quand on chauffe à sec vers 200 degrés l'acide indolacétique, était une preuve de la présence de cette substance dans les liqueurs que je venais d'examiner.

J'avais donc établi par trois réactions qu'il s'agissait bien d'acide indol-3-acétique, confirmant en somme les faits observés par Herter et Ten Broeck avec seulement deux races de *Proteus*.

Pour me placer dans de meilleures conditions, j'ai répété l'expérience que je viens de décrire en substituant à la peptone de viande une peptone tryptique de caséine que je devais à l'obligeance de M. P. Macquaire (2); les résultats ont été exactement les mêmes que dans le premier cas : 24 *Proteus*

(1) C. A. Herter, On indolacetic acid, *Journal of biological Chem.*, t. IV, 1908, p. 254.

(2) En 1911, Porcher et Panisset avaient déjà signalé l'intérêt que présenterait une peptone de cette nature pour l'étude de la fonction indologène des microbes : Les diverses peptones et la formation de l'indol. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXX, p. 464.

producteurs d'indol, 37 *Proteus* non indologènes dont 7 producteurs d'acide indol-acétique.

J'ai alors voulu rechercher si une variation plus importante dans la composition du milieu ne modifierait pas ces résultats. Pour cela j'ai utilisé un mélange de produits abiurétiques obtenus par l'hydrolyse chlorhydrique de la caséine, mais comme l'action des acides ne convient pas à la séparation du tryptophane, j'avais soin d'ajouter à ce mélange, bien décoloré par le noir animal, 1 p. 100 de tryptophane ; avec cet ensemble de constituants de la caséine, je préparais des solutions à 20 p. 1.000 qui constituaient un milieu dans lequel le *Proteus* se développait remarquablement bien. Dans ces conditions les résultats ont été identiques en ce qui concerne la production d'indol, tout au moins qualitativement, mais le nombre des échantillons producteurs d'acide indolacétique est passé de 7 à 19 ; en même temps j'ai noté que, tant pour l'indol que pour l'acide indolacétique, la production de ces substances était beaucoup plus intense qu'en milieu peptoné.

Ces faits m'ont conduit à me servir d'un milieu encore mieux adapté à l'étude de la fonction indologène, plus riche par conséquent en substances mères de l'indol et de l'acide indolacétique, c'est-à-dire en tryptophane. J'ai d'abord utilisé un milieu chimiquement défini dont j'avais déjà indiqué la composition (1) et qui renfermait, avec 1,5 p. 1.000 de tryptophane, divers autres acides aminés et des sels, mais je l'ai abandonné pour l'étude du *Proteus*, car certains de ces éléments indispensables pour nombre de microbes étaient inutiles pour une espèce protéolytique et d'une telle activité biochimique.

(1) Albert Berthelot, Sur l'emploi de milieux chimiquement définis à base de tryptophane, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 20 avril 1912, t. LXXII, p. 595. A propos des milieux de culture au tryptophane et de l'utilisation de ceux-ci pour l'étude de la fonction indologène des microbes, je tiens à signaler deux mémoires qu'un auteur allemand, Hugo Zipfel, a publiés sur ce sujet en 1912 et 1913 (*Centr. f. Bakt.* I Abt. Originale t. LXIV, juin 1912, p. 65 et t. LXVII, janvier 1913, p. 497). Ces deux mémoires ne comportent pas moins de 31 pages de texte, l'auteur y énumère un nombre considérable de travaux sur les bactéries productrices d'indol; il y indique même le procédé de préparation du tryptophane, et y donne plus de 150 indications bibliographiques; mais, par une singulière coïncidence, il se trouve que, parmi les nombreux noms d'auteurs qu'il cite, ne figurent pas celui de Seidelin et le mien. L'un et l'autre nous avons pourtant employé bien avant lui le tryptophane dans les milieux et nous l'avons appliqué à l'étude de la fonction

Pour les expériences qui vont suivre il m'a donc paru plus simple d'imiter Hopkins et Cole et d'ajouter de la gélatine à une solution nutritive analogue à celle que j'ai préconisée lors de mes premières recherches sur les microbes acidaminolytiques de la flore intestinale. La gélatine ne renfermant pas de tryptophane, le *Proteus* n'avait donc à sa disposition que celui existant à l'état libre dans le milieu, qui présentait la composition suivante :

Eau	1.000,00
Phosphate dipotassique	1,50
Sulfate de magnésium	0,50
Tryptophane	1,50
Chlorure de calcium	0,02
Gélatine	25,00

Grâce à l'amabilité de M. F. Hoffmann-La Roche qui avait mis à ma disposition une quantité assez importante de tryptophane parfaitement pur, j'ai pu étudier l'action de toutes mes races de *Proteus* sur cet acide aminé.

J'ai examiné une première série de cultures après 48 heures de séjour à 37 degrés et j'ai constaté que le nombre des échantillons producteurs d'indol était le même que dans les essais précédents; par contre il y avait 31 *Proteus* producteurs d'acide indolacétique. D'autres cultures examinées après quatre jours d'étuve m'ont donné les mêmes résultats pour l'indol, mais cette fois tous les *Proteus* non indologènes avaient produit de l'acide indolacétique. Je ne m'en suis pas tenu là et j'ai recherché si les échantillons qui avaient donné de l'indol n'avaient pas produit en même temps de l'acide indolacétique. Pour cela, après avoir alcalinisé par la soude les cultures sur milieu au tryptophane chargées d'indol, je les ai épuisées par l'éther jusqu'à ce que ce dissolvant ne m'ait plus donné de coloration avec le réactif d'Ehrlich ; après cette opération, je pus déjà observer, sur une petite portion de ces cultures complètement débarrassées d'indol, qu'elles

indologène des microbes (A. Berthelot, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 24 juillet 1911, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, avril 1912, *loc. cit.*). Zipfel n'a pas davantage tenu compte de l'excellent travail de Louis Gauthier (mars 1912 *loc. cit.*) qui a réalisé avec des méthodes analytiques précises les recherches que l'auteur allemand a exécutées avec des procédés incorrects en dépit de leur apparente exactitude. M. Zipfel oublie par trop facilement que les principes fondamentaux de l'analyse chimique ne varient pas avec l'objet auquel on les applique et que, pour caractériser un corps dans une culture microbienne, l'on doit toujours s'efforcer de l'extraire et de le purifier. En utilisant les milieux au tryptophane pour étudier systématiquement les bactéries productrices d'indol, H. Zipfel n'a fait qu'imiter certains auteurs qu'il ne daigne pas citer; il est regrettable pour lui qu'il ne se soit pas en même temps inspiré de L. Gauthier et qu'il n'ait pas acccordé un peu plus d'attention aux conseils donnés par Porcher et Panisset, car la valeur scientifique de son travail y aurait certainement beaucoup gagné.

prenaient une coloration rose par addition de nitrite et d'acide chlorhydrique, alors qu'un tube témoin du milieu stérile n'accusait qu'une légère teinte jaune. Je soumis alors ces mêmes cultures à un nouvel épuisement par l'éther après les avoir acidifiées et, après concentration de ce solvant, il me fut facile de constater la présence d'acide indolacétique.

En résumé, mes 61 *Proteus* cultivés sur tryptophane se montraient tous producteurs d'acide indolacétique au bout de quatre jours, tandis que seulement 24 d'entre eux étaient capables de former de l'indol. Ces résultats auraient pu me faire croire à l'existence de deux variétés de *Proteus* ; mais, en présence des variations de ce microbe sous l'influence du milieu, j'ai pensé qu'il devait plutôt s'agir de races différant simplement par une intensité plus ou moins grande de leur action sur le tryptophane ou les substances qui en renferment, action beaucoup trop variable pour que ses divers degrés puissent être utilisés comme caractères différentiels. Je n'ai pas tardé à m'apercevoir combien cette hypothèse était exacte.

En effet, au mois d'octobre 1912, j'ai examiné à nouveau 24 *Proteus* de diarrhées infantiles que j'avais étudiés au mois de février de la même année et qui avaient subi de nombreux passages en gélatine préparée avec du bouillon Martin ; bien que je me sois placé dans les mêmes conditions et que j'aie utilisé le même milieu (solution de peptone pancréatique de viande à 20 p. 1.000), j'ai constaté que 6 *Proteus*, qui, primitivement produisaient de l'indol et de l'acide indolacétique, ne donnaient plus que de ce dernier corps, tandis que 11 autres, qui ne formaient que de l'acide indolacétique, étaient devenus également producteurs d'indol. Le *Proteus vulgaris* présentait donc bien la grande variabilité d'action que je lui attribuais *a priori* et qui me faisait paraître peu probable l'existence de races bien fixées au point de vue du pouvoir indologène.

Ayant ainsi observé une variation spontanée de ce caractère du *Proteus*, j'ai essayé d'obtenir plus rapidement une modification analogue. Dans ce but, j'ai pris au hasard, parmi les échantillons dont l'expérience précédente m'avait montré la fixité d'action, 3 *Proteus* qui m'avaient toujours donné de l'indol, en solution de peptone pancréatique de viande, et 3 autres qui, au contraire, n'avaient jamais produit que de l'acide indolacétique. Je les ai ensemencés en même temps dans une solution de peptone pancréatique de caséine à 3 p. 100, dans une solution renfermant, avec les sels habituels, 2 p. 1.000 de tryptophane avec seulement 5 p. 1000 de gélatine et enfin dans une solution à 20 p. 1000 de l'ensemble des acides aminés qui entrent dans la constitution de la molécule de caséine.

J'ai examiné les cultures au bout de 72 heures de séjour à 37 degrés et j'ai constaté que sur peptone de caséine les 6 échantillons donnaient de l'acide indolacétique et qu'un seul des 3 indologènes donnaient de l'indol. Au contraire, sur les deux autres milieux, tous les échantillons donnaient à à la fois de l'indol et de l'acide indolacétique. Enfin, j'ai analysé de nouveau, après quinze jours d'étuve, les cultures sur peptone de caséine, mais j'ai obtenu les mêmes résultats, c'est-à-dire qu'une seule renfermait de l'indol. Pendant un mois, j'ai continué à cultiver ces 6 *Proteus* sur les trois milieux, et, après leur avoir ainsi fait subir six passages, j'ai constaté que leur action respective sur le tryptophane ne s'était pas modifiée. Par conséquent, sur six échantillons, un seul avait gardé ses propriétés primitives, trois autres semblaient avoir acquis, dans les milieux contenant du tryptophane libre, la faculté de produire de l'indol, tandis que les deux derniers, en passant par la solution de peptone de caséine, avaient perdu leur pouvoir indologène.

En présence de ces faits il était intéressant de rechercher si les propriétés des *Proteus* ainsi cultivés en milieux spéciaux étaient modifiées définitivement ou s'il s'agissait simplement de variations apparentes essentiellement dépendantes de la composition du milieu. C'est ce que j'ai fait en ensemençant à nouveau dans une solution à 20 p. 1.000 de peptone de viande les 5 échantillons dont les caractères semblaient avoir varié; j'ai alors constaté que les deux races qui avaient perdu leur pouvoir indologène ne le recouvraient pas dans le milieu primitif et que les trois autres, devenues capables de produire de l'indol, ne donnaient plus dans ce milieu que de l'acide indolacétique, ainsi qu'elles le faisaient antérieurement.

Si j'avais borné là mes recherches j'aurais pu tout au moins conclure à la possibilité de variations régressives stables; mais, connaissant l'extrême variabilité du *Proteus*, j'ai continué à étudier les races que j'avais utilisées pour mes dernières expériences. J'ai repiqué ces 6 *Proteus* sur gélatine au bouillon Martin et, après 8 passages effectués en deux mois, j'ai examiné de nouveau leurs cultures en solution de peptone de viande (72 heures à 37 degrés). Dans ces conditions, j'ai observé que les 6 échantillons avaient repris leurs propriétés primitives, c'est-à-dire que tous donnaient de l'acide indolacétique et que les trois anciens producteurs d'indol en formaient comme par le passé. Les variations apparentes du pouvoir indologène que j'avais déterminées brusquement n'étaient donc bien que des modifications essentiellement transitoires.

Enfin, j'ai étudié plus complètement l'action de ces 6 *Proteus* sur le tryptophane, à l'aide des cultures obtenues en présence de 2 p. 1.000 de cet aminoïque et de 5 p. 1.000 de gélatine. Ainsi que je l'ai déjà dit, dans ce milieu, après 72 heures à 37 degrés, les 6 échantillons ont produit de l'indol et de l'acide indolacétique. J'ai laissé séjourner des cultures à l'étuve pendant encore 15 jours et, au bout de ce temps, j'y ai trouvé beaucoup plus d'indol; par contre, c'est à peine si j'ai pu y caractériser l'acide indolacétique, alors que cette substance existait en forte proportion dans les jeunes cultures.

Toutefois, si l'acide indolacétique avait presque complètement disparu, peut-être l'indol était-il accompagné d'un autre dérivé plus simple du tryptophane? Par la recherche même de l'indol j'avais la preuve que mes cultures ne renfermaient pas de scatol, mais peut-être contenaient-elles de l'acide indol-carbonique, cette substance indologène dont Porcher a montré la présence dans les cultures de certains microbes?

Pour m'en rendre compte, j'ai employé ce qui me restait de mes six cultures de 15 jours sur tryptophane; à ce moment elles étaient déjà complètement débarrassées de leur indol par des lavages à l'éther, en présence d'un léger excès de soude. Je les ai *exactement neutralisées* avec HCl et je les ai distillées : les 6 distillats contenaient de l'indol que j'ai caractérisé par le diméthylaminobenzaldéhyde et la formation du dérivé nitrosé; le liquide distillé renfermait donc de l'acide indol-carbonique. Dans le résidu de ces distillations j'ai retrouvé les traces d'acide indolacétique dont j'avais antérieurement constaté la présence. J'ai extrait cette substance en épuisant par l'éther la liqueur légèrement acidifiée; j'ai débarrassé celle-ci de l'excès d'éther en la chauffant quelques instants au bain-marie, puis, après l'avoir étendue d'eau, je l'ai filtrée sur bougie. Dans le filtrat ainsi obtenu, avec l'eau de brome et le réactif glyoxylique, j'ai obtenu pour les six cultures les réactions caractéristiques du tryptophane; tout cet acide aminé n'avait donc pas été détruit en 15 jours par le *Proteus*.

Quant à l'acide indolcarbonique, sa présence, à côté de l'indol et de traces

d'acide indolacétique, est incontestable, car j'ai vérifié que la distillation de 200 cent. cubes de milieu au tryptophane additionné de 5 centigrammes d'acide indolacétique et exactement neutralisé donnait un distillat ne réagissant en aucune façon avec le diméthylaminobenzaldéhyde, tandis que dans les mêmes conditions 5 centigrammes d'acide indol-carbonique produisaient une quantité notable d'indol.

Ayant constaté que le *Proteus* peut donner de l'acide indol-carbonique, j'ai recherché cette substance dans des cultures de tout âge en eau peptonée ou en milieu aux acides aminés de la caséine, ainsi que dans des cultures jeunes sur tryptophane; bien que mes essais aient porté sur les six races de mes dernières expériences, je n'en ai pas trouvé par le procédé que je viens d'indiquer. Ce corps me semble exister surtout dans les vieilles cultures en milieu particulièrement favorable; en pratique, au point de vue du simple diagnostic bactériologique, il n'y a donc guère lieu de s'en inquiéter.

On a pu remarquer que, dans mes recherches, j'ai négligé l'acide indol-propionique; je tiens à faire observer que j'avais des raisons d'agir ainsi. En effet, toutes mes cultures ont été effectuées au large contact de l'air; par conséquent, en admettant que le *Proteus* ait pu produire ce corps aux dépens du tryptophane, jamais il n'aurait trouvé dans mes expériences les conditions d'anaérobiose nécessaires. D'ailleurs, aucune de mes cultures, ainsi que je l'ai établi en recherchant l'indol, ne renfermait de scatol, composé qui accompagne ordinairement l'acide indol-propionique dans la destruction anaérobie du tryptophane par certains microbes.

J'aurais dû, pour être complet, rechercher également s'il y avait formation d'indoléthylamine; si je ne l'ai point fait, c'est que la recherche de cette substance ne peut s'effectuer par des méthodes aussi simples que la caractérisation de l'indol, du scatol et des acides à noyau indolique. L'examen de ce point de la biochimie du *Proteus* m'aurait du reste trop écarté de l'étude critique du pouvoir indologène et j'ai préféré le réserver pour des recherches ultérieures.

Enfin, je tiens à insister sur ce fait, que toutes les cultures dont je me suis servi au cours de cette étude ont toujours été obtenues avec des milieux donnant, par le brome, la réaction du tryptophane libre. J'ai laissé systématiquement de côté l'étude des cultures dans lesquelles le *Proteus* aurait dû effectuer une dislocation préalable d'une molécule albuminoïde quelconque pour en libérer le tryptophane, car il m'aurait fallu tenir compte non seulement des variations de l'activité d'attaque de cet amino-acide, mais encore de la variabilité des pouvoirs protéolytique, peptolytique ou peptidolytique.

Je n'ai donc pas examiné sous toutes ses faces la question de la production d'indol par le *Proteus vulgaris*, mais comme je m'étais placé uniquement au point de vue de la diagnose précise de cette espèce, je crois avoir fait œuvre plus utile en examinant un grand nombre de races dans des conditions assez limitées, mais bien définies.

Quoi qu'il en soit, de l'ensemble de mes recherches il résulte que le *Proteus vulgaris* est un microbe qui attaque le tryptophane en donnant, par le même mécanisme que les autres aérobies étudiés par Hopkins et Cole, une série de produits dont la dégradation plus ou moins avancée marque l'intensité de son action sur la molécule aminoïque. Dans certaines cultures très âgées, en milieu contenant beaucoup de tryptophane, on peut ne trouver pratiquement que de l'indol; dans d'autres, en général assez jeunes et sur milieu pauvre en tryptophane libre, il n'y a que de l'acide indolacétique, mais ce que l'on rencontre le plus souvent c'est à la fois de l'indol et de l'acide indolacétique en proportions variables.

L'action du *Proteus* variant non seulement avec les divers échantillons, mais même pour une race donnée, il est impossible de se baser sur l'absence d'indol dans les cultures de ce microbe pour le différencier des autres espèces. Par contre, et autant que l'on puisse conclure de l'examen de 61 races, on peut dire que tous les *Proteus vulgaris* Hauser sont capables d'attaquer le tryptophane libre et de produire, aux dépens de cet acide aminé, au moins de l'acide indol-3-acétique.

L'espèce *Bacillus proteus anindologenes* Van Loghem n'a aucune raison d'être et l'on doit considérer comme *Proteus vulgaris* Hauser tout microbe possédant, avec les autres caractères de cette espèce, la propriété de donner, à 37 degrés, dans un des milieux que je viens d'indiquer, soit de l'indol ou de l'acide indolacétique, soit un mélange de ces deux corps (1).

(1) Pour la recherche du pouvoir indologène des microbes je ne saurais trop recommander les milieux à base de tryptophane; leur préparation ne présente plus de difficulté maintenant que cet acide aminé se trouve dans le commerce à un prix abordable (5 francs le gramme environ). Il y a cependant une précaution à prendre : exiger des fabricants un produit dont l'extrait éthéré ne réagisse en aucune façon avec le réactif d'Ehrlich et dont la solution aqueuse presque incolore ne donne aucune coloration rose ou rouge avec les nitrites et l'acide chlorhydrique dans les conditions habituelles.

NOTA. — Depuis que mon mémoire a été rédigé, M. E.-A.-R.-F. Baudet a publié un travail dans lequel il étudie, au point de vue de la production d'indol, quelques *Proteus* d'origines variées (Indol-reaktionen bei Proteusbacillen, *Folia Microbiologica*, t. II, 3e fascicule, 7 mars 1914).

Cet auteur emploie le diméthylaminobenzaldéhyde avec le persulfate de potassium et, comme il se sert de milieux au tryptophane, il prétend que l'on peut très bien effectuer la réaction sur la culture même; de plus, il estime que la recherche de l'indol par distillation des cultures est un

procédé parfaitement correct. M. Baudet n'est sans doute pas chimiste, car il considère comme inexistants — bien qu'il les fasse figurer dans sa bibliographie — les travaux de L. Gauthier, Porcher et des nombreux auteurs qui ont montré les inconvénients de la réaction d'Ehrlich mal appliquée et ceux de la distillation des cultures. Il prétend même découvrir les causes d'erreur que peuvent apporter les dissolvants tels que la benzine et l'alcool amylique, comme si les chimistes qu'il critique ne les avaient pas indiquées depuis longtemps et n'avaient point préconisé l'emploi de l'éther convenablement purifié.

Au point de vue des milieux au tryptophane il m'attribue *un* milieu de culture — il en donne même une formule qui comporte 50 *grammes* de SO^4Mg par litre (!) — et le trouve inférieur au milieu de Zipfel; il accorde également une grande importance au fait qu'il n'a pu réussir à faire produire de l'indol à une race indologène comme si la variation d'une propriété biochimique devait obligatoirement se produire dans les mêmes conditions pour des *Proteus* d'origines différentes. Il ne paraît, d'ailleurs, pas connaître les divers termes possibles de la dégradation bactérienne du tryptophane.

Bien qu'il cite une de mes Notes, M. Baudet n'a pas remarqué que j'ai indiqué plusieurs milieux au tryptophane et que je n'ai préconisé spécialement aucun d'eux, mais que j'ai été simplement le premier à recommander et à employer systématiquement les milieux à base de tryptophane pour l'étude de la fonction indologène des microbes. Comme il ignore certainement les travaux d'Herter et qu'il ne paraît pas connaître ceux que j'ai publiés depuis 1912 sur les milieux au tryptophane et sur les caractères du *Proteus*, je ne discuterai pas davantage ses recherches ; je me contente de faire remarquer qu'elles justifient une fois de plus les critiques que je me permets dans ce présent travail.

(*A suivre.*)

L'INDÉPENDANCE DE LA TEMPÉRATURE OPTIMALE D'UNE DIASTASE

A L'ÉGARD DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT ET EN DIASTASE

par Arthur COMPTON

(Imperial Cancer Research Fund, Londres.)

On connaît aujourd'hui plusieurs causes modificatrices de l'influence exercée par la chaleur sur l'activité d'une diastase. Parmi les mieux connues, citons d'abord l'origine de la diastase (1), sur laquelle je ferai plus loin une observation de quelque intérêt, ensuite le temps pendant lequel la diastase et son substrat (ou matière organique décomposée) se trouvent en contact (2). Il est important de bien connaître ces causes quand il s'agit de caractériser un ferment par sa température optimale, c'est-à-dire par la température à laquelle son activité est la plus grande. Ces considérations et l'intérêt qu'il y a de préciser la valeur pratique de la température optimale m'ont paru rendre nécessaire de rechercher si la concentration en substrat et la concentration en diastase modifient ou non la température optimale. En outre, des considérations d'ordre théorique m'ont amené à croire que la température optimale d'un ferment est indépendante de la concentration en substrat.

Voici ces considérations :

D'après la théorie de M. Gabriel Bertrand (3) sur la constitution des diastases, tout système diastasique comporte deux substances dont les actions se complètent : la complémentaire

(1) C. J. Lintner et F. Eckhardt, *Journ. f. pr. Chem.* (2), t. XLI, 1890, p. 91. — Gabriel Bertrand, *Bull. Soc. chim* (3), 1896, t. XV, p. 1218. — Gabriel Bertrand et W. Mutermilch, *Idem.* (4), t. I, 1907, p. 837. — Gabriel Bertrand et M. Rosenblatt, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXIV, 1910, p. 653.

(2) Gabriel Bertrand et A. Compton, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CLII, 1911, p. 1518. — M. Javillier et H. Tchernoroutzky, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXVII, 1913, p. 440.

(3) *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CXXIV, 1897, p. 1032 et p. 1385. *Revue générale des Sciences*, t. XVI, 1905, p. 459, etc.

active, et la complémentaire *activante*. La première, généralement de nature minérale, est, comme son nom l'indique, l'agent actif dans la réaction chimique qui caractérise le ferment. La seconde, de nature organique, facilement altérée par la chaleur et d'autres conditions physiques, sert, par une sorte d'effet de concentration, à rapprocher la complémentaire active et le substrat, et à produire des conditions favorables à la vitesse de leur réaction chimique.

Donc, en partant de cette théorie, on peut concevoir que, dans tout système diastasique, il existe deux concentrations du substrat : l'une *locale*, aux environs de la molécule de diastase; elle est due à l'attraction qu'exerce la complémentaire activante sur les molécules de substrat qui se trouvent dans sa sphère d'action. L'autre, *périphérique* ou *générale*, est située en dehors de la sphère d'attraction de la complémentaire activante. La concentration locale, qui dépend de l'énergie d'attraction de la complémentaire activante, sera plus ou moins constante à une température donnée, tandis que la concentration périphérique variera continuellement. On peut aisément concevoir qu'il existe, entre les deux zones de concentration, à mesure que l'action diastasique se poursuit, un échange continu de molécules de substrat pour des molécules de produits de réaction. Or la température optimale d'une diastase n'est que la température à laquelle s'équilibrent les effets accélérants et destructifs de la chaleur sur l'action qu'exerce la diastase sur le substrat environnant. Pourvu donc qu'il y ait toujours excès de substrat, ces deux effets n'affecteront évidemment que la concentration locale. Par conséquent, on a le droit de s'attendre à ce que la température optimale d'une diastase soit indépendante des variations de la concentration générale.

Cette conception m'a conduit à rechercher sa vérification expérimentale, et à étudier en même temps l'influence de la concentration en diastase sur le phénomène. Je puis donner aujourd'hui les résultats confirmatifs que j'ai obtenus avec la *salicinase*, nouvelle diastase dédoublant la salicine en glucose et saligénine, dont nous avons, M. Gabriel Bertrand et moi (1), tout récemment établi l'individualité.

(1) Gabriel Bertrand et A. Compton, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CLVII, 1913, p. 797.

La préparation diastasique que j'ai employée provient d'un extrait d'amandes douces, et je me suis assuré de la pureté de la salicine par son point de fusion +200°5 et son pouvoir rotatoire.

$$[\alpha]_{D_{21}} = -62°7.$$

Les étapes successives du travail peuvent se résumer ainsi : 1° une détermination préliminaire de l'activité de la préparation diastasique en tenant compte de certaines conditions, telles que concentration du substrat, température et durée de l'expérience ; 2° une détermination préliminaire de la température optimale, en employant la quantité de diastase capable d'hydrolyser 50 p. 100 de substrat dans les mêmes conditions de durée et de concentration en substrat ; 3° une détermination des courbes d'activité de la diastase à la température ainsi établie, pour cinq concentrations de substrat, M/5, M/10, M/15, M/30, et M/50, l'action ayant la même durée ; 4° une détermination de la température optimale de la diastase pour chacune des cinq concentrations du substrat, en présence d'une concentration constante de diastase ; 5° une détermination de la température optimale de la diastase, pour chacune des cinq concentrations de substrat, avec les quantités de diastase — indiquées par les courbes d'activité ci-dessus — capables de produire 70 p. 100 d'hydrolyse de substrat en 15 heures ; 6° une détermination de la température optimale de la diastase pour une concentration constante de substrat en présence de concentrations différentes de diastase.

La détermination préliminaire de l'activité de la diastase est faite en présence d'une solution M/5 de substrat pendant 15 heures à 40 degrés. Sept tubes à essai soigneusement nettoyés reçoivent, chacun, 286 milligrammes de salicine et une quantité différente de diastase dissoute dans 5 cent. cubes d'eau spécialement purifiée par redistillation dans le vide. Les tubes sont placés dans le bain-marie à 40 degrés pendant 15 heures. On arrête alors l'action diastasique en refroidissant les tubes dans un courant d'eau et en les additionnant d'une goutte d'ammoniaque. Ensuite, d'après la méthode de Gabriel Bertrand (1),

(1) *Bull. Soc. chim.* (3), t. XXXV, 1906, p. 1285.

on dose la quantité de glucoside dédoublée dans chaque tube. Les chiffres obtenus sont indiqués dans le tableau I.

TABLEAU I.

QUANTITÉ DE DIASTASE en milligr.	SALICINE HYDROLYSÉE p. 100.
—	—
0,6	34,8
1,5	67,2
3,0	86,8
4,5	91,2
6,0	91,7
7,0	96,1
9,0	97,0

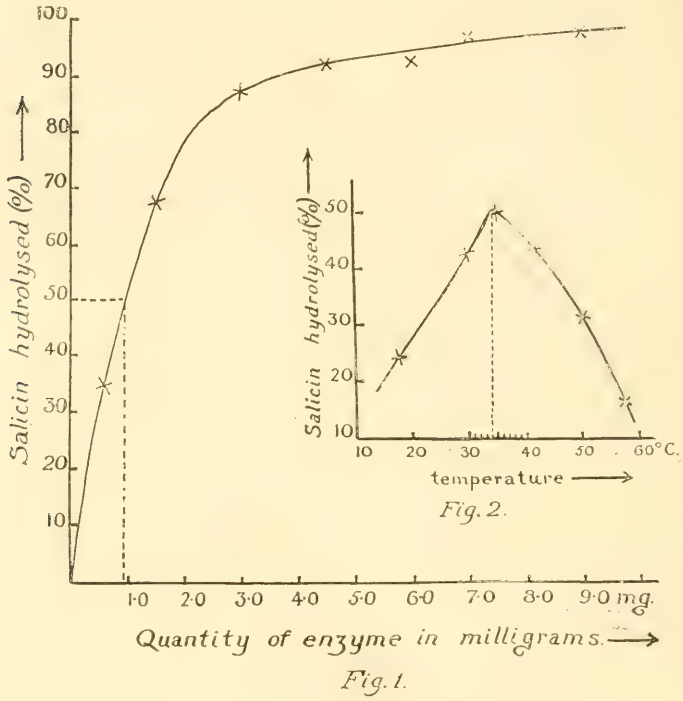
Si l'on porte en abscisses les quantités de diastase et, en ordonnées, les pourcentages de salicine hydrolysée, ces chiffres donnent la courbe d'activité représentée par la figure 1.

La détermination préliminaire de la température optimale de la diastase se fait de la façon suivante. On dissout dans 10 cent. cubes d'eau pure, 10 fois la quantité de diastase nécessaire, indiquée par la figure 1, pour produire le pourcentage voulu d'hydrolyse du substrat, — c'est-à-dire, 0,9 milligramme de diastase, produisant une hydrolyse de 50 p. 100 du substrat en 15 heures. — Après un contact d'une 1/2 heure à 1 heure, à la température ordinaire, on distribue cette solution à raison de 1 cent. cube par tube, dans une série de 8 à 9 tubes à essai contenant chacun 286 milligrammes de salicine et 4 cent. cubes d'eau. Les tubes sont plongés ensuite dans des bains-marie réglés à des températures constantes; au bout de 15 heures on arrête l'action diastasique et on dose la proportion de glucoside hydrolysé. Le tableau II contient les chiffres obtenus.

TABLEAU II.

TEMPÉRATURES EXTRÊMES de chaque expérience.	SALICINE HYDROLYSÉE p. 100.
—	—
17°8 à 17°6	24,2
29°3 à 29°5	42,8
34°7	50,0
41°8 à 41°7	43,0
50°2 à 50°3	31,4
57°5 à 57°6	16,4

En portant en ordonnées le pourcentage de salicine hydrolysée et en abscisses la température de l'expérience, ces chiffres donnent la courbe de la figure 2. Dans ces conditions,



Abscisses des figures 1 et 3 : Quantité d'enzyme en milligrammes.
Ordonnées de toutes les figures : Salicine hydrolysée p. 100.

la température optimale se trouve ainsi aux environs de + 34 degrés.

On détermine ensuite l'activité de la diastase aux environs de + 34 degrés (exactement 33°6-33°8), dans une action de 15 heures de durée, avec les concentrations suivantes de substrat : M/5, M/10, M/15, M/30 et M/50, dont on veut ultérieurement étudier l'effet sur la température optimale de la diastase.

Les autres détails techniques sont les mêmes qu'auparavant. Les chiffres obtenus sont donnés dans le tableau III.

TABLEAU III.

QUANTITÉ DE DIASTASE EN MILLIGR.	SALICINE HYDROLYSÉE P. 100 AVEC CONCENTRATION DE SUBSTRAT				
	M/5	M/10	M/15	M/30	M/50
0,5	»	31,4	35,8	28,2	»
1,0	55,1	57,5	58,5	49,5	36,9
2,0	79,4	84,7	88,7	77,0	»
3,0	88,3	93,9	97,5	90,0	77,2
5,0	94,2	97,5	99,6	99,0	93,9
7,0	94,9	96,7	99,2	100,6	100,0
10,0	95,7	100,2	99,6	»	100,5
12,5	95,7	»	100,6	100,6	100,0

En portant en ordonnées le pourcentage de salicine hydrolysée, en abscisses la quantité de diastase en action, on a les courbes d'activité de la figure 3.

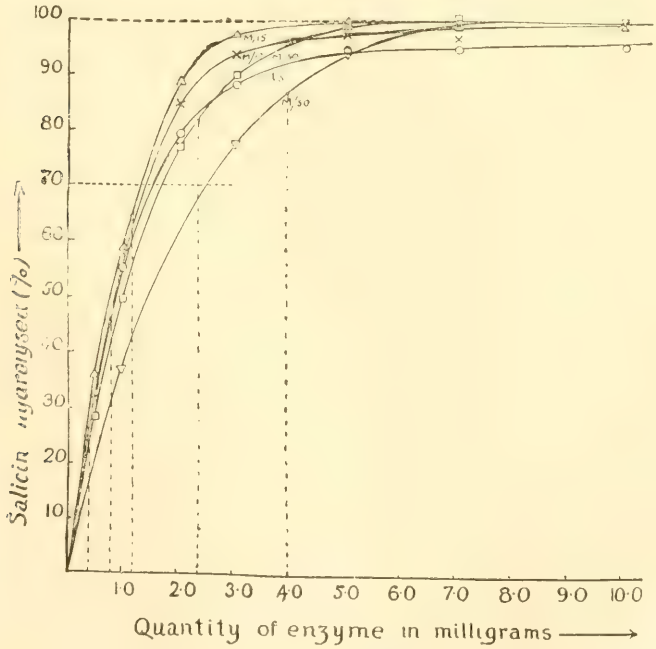


Fig. 3.

On peut maintenant envisager l'influence de la concentration en substrat sur la température optimale du ferment. Il s'agit

d'étudier la température optimale dans une série d'expériences où la concentration en diastase reste constante, tandis que la concentration en substrat varie. On a choisi, d'après la figure 3, comme concentration en diastase, 8×10^{-5} grammes par centimètre cube. On laisse reposer, 1/2 heure à 1 heure, à la température ordinaire, cinq solutions différentes contenant 4, 8, 12, 24 et 40 milligrammes de diastase, dissous dans 10 cent. cubes d'eau. Ces solutions sont réparties à raison de 1 cent. cube par tube dans cinq séries de tubes à essai, contenant 286 milligrammes de salicine et 4, 9, 14, 29 et 49 cent. cubes d'eau. Après 15 heures d'incubation dans des bains-marie réglés à des températures connues, on arrête l'action diastasique et on dose la quantité de salicine hydrolysée dans chaque tube, comme auparavant. Les chiffres obtenus sont ceux du tableau IV.

Tableau IV.

Températures extrêmes de chaque expérience	Salicine hydrolysée p. 100 avec concentration en substrat				
	M/5	M/10	M/15	M/30	M/50
7°3 à 7°7	. . . .	10,8			
8°3 à 9°0	6,6				
9°6 à 8°5	. . .	. . . .	18,3		
9°4 à 10°8	. . . .	. . . .	. . . .	26,0	
12°0 à 10°9	. . . .	. . . .	. . . .	. . . .	35,5
17°2 à 17°3	. . . .	23,0			
17°4 à 17°1	10,8				
17°5 à 17°6	. . . .	. . . .	32,5		
18°6 à 18°5	. . . .	. . . .	. . . .	. . . .	57,5
18°9	. . . .	. . . .	. . . .	47,0	
25°2 à 25°0	. . . .	. . . .	. . . .	63,7	
26°4 à 25°7	. . . .	. . . .	. . . .	. . . .	75,0
26°5	19,2	38,6	50,8		
30°0	22,3	41,9	58,5	75,3	
30°5	. . . .	. . . .	. . . .	. . . .	75,8
33°5	23,6	44,6	62,9	80,7	88,3
40°5	. . . .	. . . .	. . . .	68,3	76,7
40°7 à 40°6	. . . .	39,4			
40°8 à 40°7	22,4	. . . .	55,2		
45°0 à 45°2	. . . .	. . . .	. . . .	. . . .	56,9
45°5 à 45°3	19,7	35,0	43,7		
45°5	. . . .	. . . .	. . . .	54,7	
50°3 à 50°5	15,1	. . . .	31,9		
50°6 à 50°5	. . . .	25,8			
51°1 à 50°8	. . . .	. . . .	. . . .	34,3	
51°5 à 51°2	. . . .	. . . .	. . . .	. . . .	38,3
54°3 à 54°0	11,2				
54°2 à 54°3	. . . .	18,4	21,4	24,3	
54°6 à 55°0	. . . .	. . . .	. . . .	. . . .	25,8

Ces chiffres donnent les courbes de la figure 4.

Ces courbes montrent, quoique avec des degrés de précision bien différents, des maxima dans la même région de température. Elles produisent l'impression générale que la température optimale de la diastase est constante et, par conséquent, indépendante de la concentration en substrat. Pour faire ressortir cette indépendance de façon plus précise, il faut des courbes

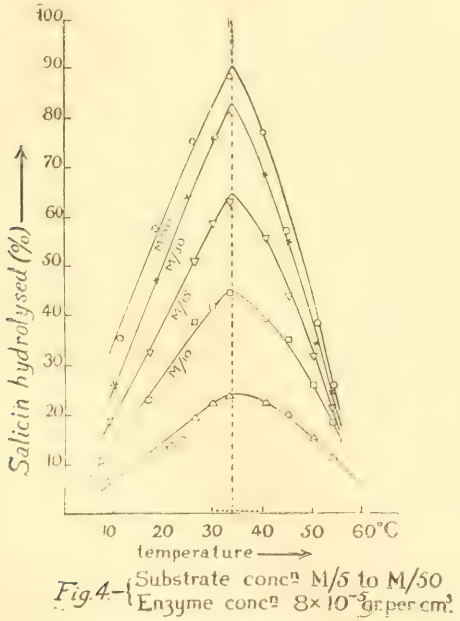


FIG. 4-10 : Substrate concⁿ = concentration du substrat.
— Enzyme concⁿ ..... gr. par cm³ = concentration de l'enzyme ..... gr. par cm³.

de type uniforme, facilement comparables entre elles. On n'atteint ce but qu'en faisant varier la concentration de la diastase en même temps que celle du substrat, car, *cœteris paribus*, ce qui détermine l'étendue de l'action diastasique, c'est, comme le démontrent les courbes d'activité 1 et 3, le rapport du nombre de molécules de diastase au nombre donné de molécules de substrat, présentes dans le milieu de réaction.

Tableau V.

TEMPÉRATURES EXTRÊMES de chaque expérience	SALICINE HYDROLYSÉE P. 100 EN 15 HEURES avec concentration moléculaire de substrat et concentration diastasique en grammes par cent. cube					
	M/5 31×10^{-5}	M/10 $13,5 \times 10^{-5}$	M/15 $8,7 \times 10^{-5}$	M/30 $5,7 \times 10^{-5}$	M/50 5×10^{-5}	
8°0	....	....	17,2			
9°0 à 8°3	....	17,3				
9°5 à 9°0	....	....	....	18,8		
17°8 à 17°5	35,0					
18°1 à 18°2	....	34,2				
18°2 à 18°4	....	....	....	....	39,7	
18°4	....	....	....	....	....	41,9
18°7 à 18°5	....	....	....	40,3		
18°8 à 18°7	....	....	36,3			
23°1 à 22°5	46,1					
24°9 à 25°1	....	....	....	....	50,5	
26°1 à 26°2	....	....	53,3			
26°2 à 26°4	....	....	....	50,3	....	61,1
27°0	....	56,9				
29°7	62,2					
30°0 à 30°5	....	....	....	65,7		
30°5	....	....	....	....	68,6	69,4
31°8 à 31°6	....	....	63,7			
33°5 à 33°8	....	69,4	65,8			
33°8	....	....	....	70,0	....	70,0
34°7 à 34°8	....	....	....	....	71,7	
35°6 à 35°7	....	....	65,8			
36°0	....	69,4				
36°6	....	....	....	66,3		
39°4 à 39°9	....	....	....	....	59,7	
41°8 à 42°0	60,5	58,3				
42°5 à 43°0	....	....	....	56,3		
43°0	....	....	....	....	....	53,0
43°6 à 43°5	....	....	51,2			
44°0 à 44°4	....	....	....	....	47,0	
47°8 à 48°0	....	43,3				
48°0 à 48°5	....	....	....	37,7		
48°5	....	....	37,7	....	....	36,4
49°0 à 49°5	....	....	....	....	34,1	
50°2	44,6					
51°0	....	35,6				
51°7 à 51°5	....	....	30,7			
53°5	....	....	....	22,7		
53°5 à 53°8	....	....	....	....	22,5	22,4
54°6	33,6					
57°5 à 57°4	23,7					

En vue d'avoir des courbes assez prononcées pour que les points maxima soient nettement définis, j'ai voulu obtenir une hydrolyse de 70 p. 100 de substrat à la température optimale pour chaque dilution de substrat étudiée. Un examen rapide de la figure 3, dont les courbes ont été construites à la température d'environ + 34 degrés, montre que pour obtenir

ces courbes de température optimale — en admettant pour l'instant ce dont la figure 4 indique déjà la probabilité, à savoir, que la température optimale est indépendante de la concentration en substrat et est située approximativement vers + 34 degrés — les quantités de diastase qu'il faut employer sont 1,55; 1,35; 1,30; 1,70 et 2,50 milligrammes respectivement pour des con-

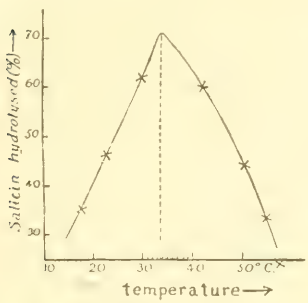


Fig. 5.—{Substrate concn M/5. Enzyme concn 31×10⁻³ gr. per cm³

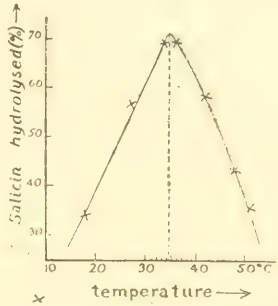


Fig. 6.—{Substrate concn M/10. Enzyme concn 13·5×10⁻³ gr. per cm³

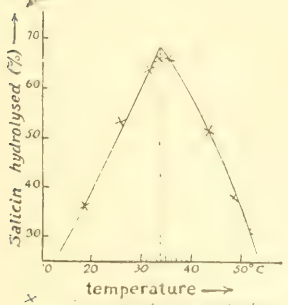


Fig. 7.—{Substrate concn M/15 Enzyme concn 8·7×10⁻³ gr. per cm³

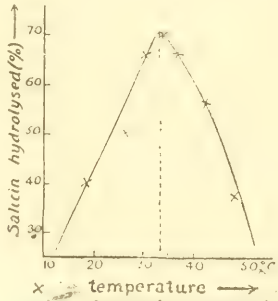


Fig. 8.—{Substrate concn M/30 Enzyme concn 5·7×10⁻³ gr. per cm³

centrations de substrat : M/5, M/10, M/15, M/30 et M/50. Les résultats obtenus avec ces quantités sont résumés dans le tableau V.

Avec les pourcentages de salicine hydrolysée pour ordonnées, et les températures pour abscisses, ces chiffres donnent les courbes représentées par les figures 5, 6, 7, 8 et 9.

Un simple examen démontre que l'activité de la diastase atteint son point maximum dans ces cinq courbes entre les températures de + 33°5 et + 34°5; en d'autres termes, que la température optimale se trouve au voisinage de + 34 degrés,

et qu'elle est constante malgré les grandes variations de dilution du substrat et les variations correspondantes de dilution de la diastase.

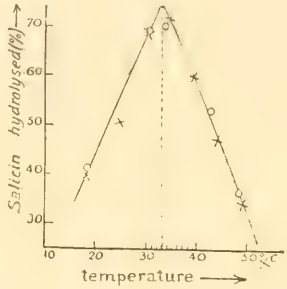


Fig. 9.—{ Substrate concⁿ M/50.
Enzyme concⁿ 5×10^{-5} gr. per cm³.

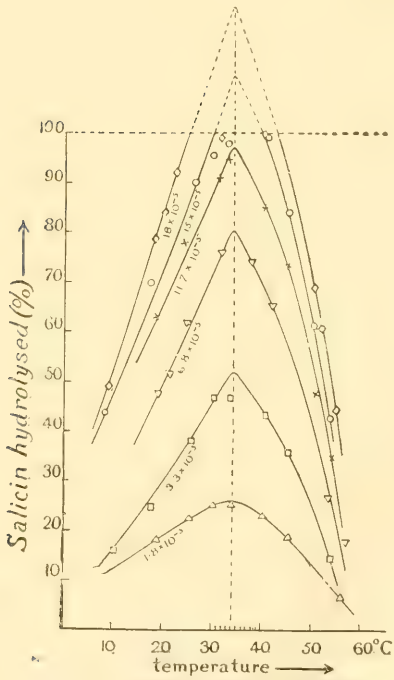


Fig. 10.—{ Substrate concⁿ M/30.
Enzyme concⁿ $1{\cdot}8 \times 10^{-5}$ to 18×10^{-5} gr. per cm³.

Il reste maintenant à examiner le cas où la concentration en substrat reste constante tandis que celle de la diastase change. C'est en cela que consiste l'étude, proprement dite, de l'influence de la concentration en diastase sur la température optimale.

Bien que rendue peu nécessaire par ce qui précède, cette dernière expérience complète le travail. On choisit comme concentration de substrat M/30, et la température optimale est déterminée dans une action de 15 heures de durée, avec des quantités de préparation diastasique, comprises entre $1,8 \times 10^{-5}$ et 18×10^{-5} gr. par cent. cube. Les chiffres obtenus sont contenus dans le tableau VI.

TABLEAU VI.

TEMPÉRATURES EXTRÊMES de chaque expérience	SALICINE HYDROLYSÉE P. 100 EN 15 HEURES avec concentration diastasique en grammes par cent. cube					
	$1,8 \times 10^{-5}$	$3,3 \times 10^{-5}$	$6,8 \times 10^{-5}$	$11,7 \times 10^{-5}$	15×10^{-5}	18×10^{-5}
8°5 à 8°3	....	....	....	....	43,7	
9°5 à 8°5	....	....	....	....	....	48,7
10°0 à 10°5	....	16,0				
17°5	....	....	....	....	70,0	
17°8 à 17°9	....	24,7				
18°2 à 18°0	....	....	....	....	....	78,7
18°7 à 18°6	....	....	....	63,0		
19°0	18,3					
19°5 à 19°0	....	....	47,7			
20°3 à 20°1	....	....	....	....	....	84,0
21°5 à 21°1	....	....	51,6			
22°5	....	....	....	....	....	92,0
24°4	....	....	....	78,0		
24°8 à 24°9	....	....	61,7			
25°5 à 25°6	22,5					
25°8 à 25°6	....	38,0				
26°2	....	....	....	....	90,0	
30°0	....	....	....	....	95,3	
30°2	25,2	46,8				
30°4 à 31°6	....	....	....	91,0		
31°1	....	....	....	....	....	99,0
31°6 à 31°7	....	....	76,0			
32°9 à 33°1	....	....	....	94,7		
33°5	....	46,8	....	....	98,0	
34°0	25,2					
37°6 à 37°8	....	....	74,2			
40°0 à 39°9	....	....	....	....	....	99,7
40°2	23,0					
40°5	....	43,3	....	85,0		
40°7	....	....	....	....	99,0	
41°8 à 42°0	....	....	65,3			
45°0 à 45°2	....	35,8	....	73,3	84,0	
45°0 à 45°4	18,8					
49°1 à 49°0	13,5					
50°5 à 50°4	....	....	....	....	61,3	69,0
51°1 à 51°0	....	....	....	47,7		
52°2 à 51°6	....	....	....	....	....	60,7
53°6 à 53°5	....	....	26,8			
54°0	....	14,6	....	....	42,7	
54°3	....	....	....	35,0		
55°0	....	....	....	....	....	44,3
56°0	6,5					
57°0	....	....	18,0			

Ces résultats sont résumés dans les courbes de la figure 10.

Les courbes de la figure 10, aussi bien que la courbe M/30 de la figure 4 et celle de la figure 8, démontrent que la température optimale de la diastase est partout la même, qu'elle est, par conséquent, indépendante de la concentration en diastase. Il en est de même, comme le démontrent deux des courbes de la figure 10, lorsque le rapport de la quantité de diastase à la quantité de substrat est plus que suffisant pour produire une hydrolyse totale du substrat au voisinage de la température optimale. Dans ces deux cas, le point optimal est imaginaire et correspond au point d'intersection des courbes représentant respectivement l'accélération et la destruction de la diastase par la chaleur.

On peut donc dire que la température optimale de la *salicinase* d'amandes douces est indépendante, pour une action d'une durée connue, à la fois de la concentration en substrat et de la concentration en diastase. Cette observation est-elle vraie pour tous les ferments? C'est là une question à laquelle j'espère pouvoir répondre bientôt par de nouvelles expériences avec d'autres types de diastases.

Je signalerai enfin un fait de quelque intérêt, démontré incidemment au cours de ces recherches. Tout récemment, M. Gabriel Bertrand et moi (1) avons trouvé, comme température optimale de la *salicinase* d'amandes douces, 42°5, dans une action de 15 heures de durée — la concentration du substrat étant M/27,4 — c'est-à-dire une température optimale qui dépasse de 8°5 celle de la préparation dont je m'occupe aujourd'hui. Donc une même diastase qui provient de sources différentes peut non seulement se comporter différemment sous l'influence de la température, mais il faut s'attendre aussi à des variations dans des préparations qui ont la même origine.

(1) *Loc. cit.*

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU GONOCOQUE

par P. FORGEOT

(Travail du laboratoire de M. Morax).

La plupart des auteurs attachent à la recherche imaginée par V. Lingelsheim, pour le diagnostic différentiel des microbes du groupe *gonocoque*, *méningocoque*, *catarrhalis*, une très grosse importance. On sait que cette méthode est basée sur les propriétés fermentatives des microbes vis-à-vis des sucres; celles-ci sont appréciées par le « virage » au rouge plus ou moins accusé de la teinture de tournesol dont le milieu de culture sucré est additionné. On résume, généralement, l'action sur les sucres des trois microbes dans le tableau suivant :

MICROBES	DEXTROSE	LÉVULOSE	GALACTOSE	MANNITE	DULCITE	SACCHAROSE	MALTOSE	LACTOSE	INULINE
Méningocoque .	+	0		0	0	0	+	0	0
Catarrhalis . .	0	0		0	0	0	0	0	0
Gonocoque . .	+	0	0	0	0	0	0	0	0

On voit que : le *catarrhalis* ne fait fermenter aucun sucre : le *gonocoque* fait fermenter uniquement le dextrose, le *méningocoque* fait fermenter à la fois le dextrose et le maltose.

M. le Dr Morax, qui a pratiqué de très nombreuses recherches sur les caractères fermentatifs des gonocoques provenant soit de l'urètre, soit, plus souvent, de l'œil, avait toujours vu jusqu'ici se vérifier la règle posée par V. Lingelsheim.

Au cours de recherches sur la toxine gonococcique, nous avons examiné également un grand nombre d'échantillons de gono-

coques, et nous avons eu la surprise de constater que l'un d'eux, que nous dénommerons « *Vid...* », avait la curieuse propriété de faire fermenter d'une façon fort nette à la fois le dextrose et le maltose. Ce gonocoque a été isolé d'une ophtalmie par M. Morax, dans son service de l'hôpital Lariboisière.

Il s'agissait d'un enfant de quatre ans, Vid..., qui fut présenté le 8 novembre 1912, pour une conjonctivite purulente bilatérale avec sécrétion assez abondante, mais sans lésions de la cornée. L'examen de la sécrétion montrait l'aspect typique des gonocoques intracellulaires, et le tube de gélose ascite ensemencé donna en vingt-quatre heures de nombreuses colonies ayant tous les caractères du gonocoque. L'enfant fut traité à la consultation et son affection ne présenta aucune particularité. L'étiologie de son infection oculaire n'avait pu être précisée. Le seul renseignement obtenu indiquait l'existence de pertes blanches assez abondantes chez la mère de l'enfant. L'examen bactériologique de ces pertes ne fut pas pratiqué.

Nous avons alors recherché comment ce gonocoque se comportait vis-à-vis d'autres sucres, et nous avons vu qu'il faisait fermenter également le galactose et la dulcite. Voici, par comparaison avec le tableau précédent, la série des réactions sucrées du gonocoque « *Vid...* »

MICROBES	DEXTROSE	LÉVULOSE	GALACTOSE	MANNITE	DULCITE	SACCHAROSE	MALTOSE	LACTOSE	INULINE
Méningocoque .	+	0	0	0	0	0	+	0	0
Catarrhalis . .	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gonocoque . .	+	0	0	0	0	0	0	0	0
Vid.	+	0	+	0	+	0	+	0	0

Nous sommes donc en présence d'un microbe qui, par son origine et son histoire clinique, paraît être nettement un gonocoque et qui, par ses réactions sucrées, se rapproche du méningocoque.

Ce microbe appartient-il à l'une de ces deux espèces ou à une espèce différente?

Il y a lieu de remarquer, en faveur de la première hypothèse,

que l'affection humaine dont il a été isolé a présenté les caractères habituels de l'infection blennorragique, avec cette restriction qu'il s'agissait d'un enfant mâle, infecté directement dans sa muqueuse oculaire sans infection urétrale. On rencontre parfois des cas de ce genre dus à une contamination indirecte par les linges ou objets de toilette. En admettant la nature gonococcique des pertes maternelles, l'infection de l'enfant s'expliquerait par le transport du pus vaginal.

On ne connaît, d'ailleurs, qu'un très petit nombre d'observations où d'autres agents infectieux morphologiquement analogues au gonocoque (*diplocoques ne prenant pas le Gram*) ont été considérés comme susceptibles de produire l'ophtalmie purulente (pseudo-gonocoques de Brons). Frenkel a bien cité un cas d'infection conjonctivale par le méningocoque, mais cette étiologie n'a généralement pas été admise.

Les essais d'agglutination de notre microbe par le sérum antiméningococcique ont été nettement négatifs aux taux ci-après : 1/10, 1/20, 1/50, 1/100, même après 12 heures.

Dans le but de rechercher s'il existait des caractères différentiels entre le gonocoque « *Vid...* » et un gonocoque de même origine, nous avons étudié parallèlement les résultats de l'inoculation de ce premier microbe (vivant ou mort) avec ceux fournis par l'inoculation du gonocoque « Leroy », provenant d'une ophtalmie gonococcique de l'adulte.

Microbes vivants. — Sujet d'expérience : cobaye de 300 à 350 grammes.

a) *Sous la peau.* La valeur d'une spatule ordinaire de gonocoque « *Vid...* » représentant le grattage de la surface d'un tube de culture de 24 heures sur gélose-ascite, détermine, le lendemain, l'apparition d'un œdème du volume d'une noix au niveau duquel la peau est rouge vif; cet œdème augmente, et, après 36 heures, on voit apparaître une petite eschare ayant les dimensions d'une lentille, puis l'œdème diminue, l'eschare tombe le 4e jour et laisse sourdre une goutte de pus. — Même lésions avec le gonocoque Leroy.

b) *Dans la veine.* La moitié de la dose précédente détermine la mort dans la nuit; à l'autopsie, on note simplement une congestion violente des poumons. — Mêmes lésions avec le gonocoque Leroy.

c) *Dans le péritoine.* La même dose que dans la veine donne la mort dans la nuit. A l'autopsie, on trouve un abondant exsudat péritonéal qui, ensemencé, donne des cultures du gonocoque. Le sang au cœur est stérile. — Mêmes lésions avec le gonocoque Leroy.

Microbes morts. — Ces microbes, obtenus par le râclage des cultures sur boîtes de Roux, sont mis à dessécher pendant 48 heures sur boîtes de Petri,

dans le vide sulfurique, puis triturés dans un mortier stérile, pour les réduire en poudre fine.

a) *Injections sous-cutanées.* Nous avons injecté les doses suivantes de « *Vid...* » : 2, 1 et 1/10 de centigramme. Seules les doses de 2 et 1 centigramme donnent des lésions appréciables qui peuvent se résumer ainsi : le lendemain, œdème mou variant, suivant la dose, d'une noix à une noisette ; tache violette à la peau dont les dimensions varient de 1 millimètre à $0^{mm}50$; 3 jours après, l'eschare, d'abord humide, commence à sécher, puis s'élimine avec le 5e jour. L'abcès se cicatrise très rapidement. Avec des doses supérieures à 5 centigrammes, on tue le cobaye en 12-24 heures.

b) *Injections intraveineuses.* Les doses de 2, 1 centigramme du gonocoque « *Vid...* » déterminent la mort dans la nuit. Si on force la dose (5 centigrammes et au-dessus), on a la mort en quelques minutes (30 minutes habituellement) ; l'animal titube immédiatement, présente de l'apnée, puis tombe sur le côté et meurt. A l'autopsie, on trouve la rate hypertrophiée et noirâtre, le foie congestionné, ainsi que les reins ; l'intestin est normal.

Au-dessous de 1 centigramme, la mort est plus tardive ; avec 1/10 de centigramme, on a la mort en 24 heures une fois sur deux. *C'est la dose minima mortelle.*

Le gonocoque Leroy donne les mêmes lésions aux mêmes doses.

Au cours de ces inoculations, un certain nombre d'animaux ayant résisté, nous nous sommes demandé s'ils n'auraient pas acquis une certaine immunité vis-à-vis de doses plus élevées.

Notre premier essai a porté sur le cobaye, dont 4 avaient été injectés dans la veine aux doses de 1/10 et 1/100 de centigramme et 2 sous la peau à la dose de 2 centigrammes. Tous reçurent, dans la veine, 1/2 centigramme, dose sûrement mortelle dans la nuit.

Voici les résultats :

PREMIÈRE INJECTION (27 décembre 1912)	DEUXIÈME INJECTION (17 janvier 1913)	RÉSULTATS
2 centigr. sous la peau . .	1/2 centigr. dans la veine. Id.	Mort dans la nuit. Mort dans la nuit.
1/10e centigr. dans la veine.	1/2 centigr. dans la veine. Id.	Résiste. Résiste.
1/100e centigr. dans la veine.	1/2 centigr. dans la veine. Id.	Résiste. Résiste.
Témoins.	1/2 centigr. dans la veine. Id.	Mort dans la nuit. Mort dans la nuit.

Il résulte de cet essai que l'injection *sous-cutanée* de doses assez élevées de microbes morts ne confère aucune immunité, alors que l'injection *intraveineuse*, *même à dose faible*, permet

aux animaux de résister à une dose, mortelle dans la nuit, pour les témoins.

Nous avons répété cet essai d'immunisation sur 6 nouveaux cobayes en commençant par le 1/100 de centigramme (le 1/10 de centigramme amenant parfois la mort, comme nous l'avons dit plus haut) : l'un de ces animaux est mort accidentellement.

Nous résumerons, dans le tableau ci-dessous, cette expérience.

NUMÉROS des Cobayes	DATE ET DOSE de la première injection	DATE ET DOSE de la deuxième injection	DATE ET DOSE de la troisième injection
64 F	9 avril 1913 : 1/100e centigr. aucun symptôme.	2 mai 1913 : 1/10e centigr. aucun symptôme.	16 mai 1913 : 1/2 centigr. aucun symptôme.
65 F	9 avril 1913 : 1/100e centigr. aucun symptôme.	2 mai 1913 : 1/10e centigr. aucun symptôme.	16 mai 1913 : 1/2 centigr. aucun symptôme.
66 F	9 avril 1913 : 1/100e centigr. aucun symptôme.	2 mai 1913 : 1/10e centigr. aucun symptôme.	16 mai 1913 : 1/2 centigr. aucun symptôme.
67 F	9 avril 1913 : 1/100e centigr. aucun symptôme.	2 mai 1913 : 1/10e centigr. aucun symptôme.	16 mai 1913 : 1/2 centigr. aucun symptôme.
68 F	9 avril 1913 : 1/100e centigr. aucun symptôme.	2 mai 1913 : 1/10e centigr. aucun symptôme.	16 mai 1913 : 1/2 centigr. aucun symptôme.
Témoin de la 1re injection.	9 avril 1913 : 1/100e centigr. Rien.	»	
Témoin de la 2e injection.	»	2 mai 1913 : 1/100e centigr. Très mal le soir mais se remet dans la nuit.	
Témoin de la 3e injection.	»	»	16 mai 1913 : 1/2 centigr. mort dans la nuit.

Ces 5 cobayes ont enfin reçu une 4e injection intraveineuse de 1 centigramme le 28 mai 1913. Tous ont succombé dans la nuit.

Conclusion. — On peut arriver à donner au cobaye, par injection intraveineuse de petites doses *faiblement* croissantes de microbes morts, une certaine immunité.

Avant la 4e épreuve, nous avons prié M. M. Nicolle de prélever une certaine quantité de sang du cœur du cobaye 67 F ; le len-

demain, nous retirons le sérum qui a exsudé (1/2 cent. cube) pour rechercher s'il possède un pouvoir antitoxique appréciable *in vivo*. Voici le résultat de cette expérience :

84 F. Injection intraveineuse du mélange. { 1/2 centigr. *Vid...* + 1/2 centigr. sérum cobaye 67 F.
Mort dans la nuit.
86 F. Témoin. Injection intraveineuse de 1 centigr. *Vid...*
Mort dans la nuit.

L'immunité conférée au cobaye n'est donc pas appréciable par mélange du sérum et du microbe mort (dans les conditions de l'expérience).

Conclusions générales.

1° Si on admet que le microbe étudié est un gonocoque, la règle donnée par V. Lingelsheim ne serait pas absolue ;

2° La méthode d'agglutination doit compléter toujours cette première épreuve ;

3° L'immunisation du cobaye par les microbes morts pourra, sans doute, fournir aux chercheurs d'utiles indications pour l'identification de l'espèce microbienne isolée. Il eût été, en effet, intéressant de voir si l'immunité conférée au cobaye était spécifique du microbe « *Vid...* », ou si elle se manifestait également à l'égard du gonocoque « Leroy » et non vis-à-vis du méningocoque. Des circonstances indépendantes de notre volonté nous ont empêché de poursuivre ces recherches.

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

28e ANNÉE NOVEMBRE-DÉCEMBRE 1914 N° 11-12
(Paru le 25 Janvier 1915).

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

LES LEISHMANIOSES CHEZ LES ANIMAUX

par A. LAVERAN.

II. — INFECTIONS EXPÉRIMENTALES PRODUITES CHEZ DIFFÉRENTES ESPÈCES ANIMALES PAR LA LEISHMANIA INFANTUM

Le kala-azar méditerranéen dont l'agent est la *L. infantum* est inoculable au chien, au chacal, à différentes espèces de singes, à la souris, au rat, plus difficilement au cobaye et au lapin.

Le procédé d'inoculation, qui donne les meilleurs résultats, consiste à injecter dans le péritoine ou dans le foie des animaux en expérience le produit du raclage ou du broyage de la rate, du foie ou de la moelle osseuse de sujets fortement infectés de leishmaniose (malades ayant succombé au kala-azar, animaux infectés expérimentalement).

L'inoculation intrahépatique est à conseiller chez le chien et le singe; la dose de virus doit toujours être très forte; on injectera à un chien 2 à 4 cent. cubes au moins d'une émulsion épaisse de pulpe de rate ou de foie dans de l'eau physiologique.

Chez les rats et les souris, les injections faites dans la cavité péritonéale donnent de bons résultats.

Les injections dans le tissu conjonctif sous-cutané sont le plus souvent sans effet.

« *A priori*, on pouvait espérer que l'inoculation des éléments flagellés, très mobiles, qui pullulent dans les cultures de la *L. infantum*, réussirait mieux que celle des formes endocellulaires, immobiles, du parasite. Il n'en est rien. La difficulté qu'on éprouve à infecter des animaux avec les cultures de la *L. infantum* provient sans doute de ce que les flagellés deviennent rapidement la proie des phagocytes (1); au contraire, les *Leishmania*, telles qu'on les rencontre dans les tissus, peuvent vivre et se multiplier dans les éléments cellulaires qui les ont englobées. La destruction de ces éléments met en liberté des *Leishmania* qui propagent l'infection. Il est à remarquer que, chez les animaux inoculés avec de la pulpe d'organes, on ne trouve jamais d'éléments flagellés ni dans le sang, ni dans l'exsudat péritonéal (après inoculation intrapéritonéale), ni dans les tissus.

« Les cultures anciennes, ayant subi de nombreux passages, sont moins virulentes que les cultures récentes.

« Les moyens naturels de transmission de la maladie, à l'aide de quantités très faibles de virus déposées sans doute dans la peau ou dans le tissu conjonctif sous-cutané, sont évidemment plus puissants que ceux dont nous disposons (2). »

Chien. Chacal. — En 1908, C. Nicolle a annoncé qu'il avait réussi à infecter un jeune chien avec le virus du kala-azar infantile (3). Le chien avait été inoculé dans le foie et dans la cavité péritonéale, une première fois avec une goutte de sang provenant d'une ponction de la rate pratiquée chez un enfant atteint de kala-azar : la deuxième fois, avec le produit de broyage d'un fragment de la rate recueilli à l'autopsie du même enfant. Le chien, sacrifié 159 jours après la première inoculation, 80 jours après la seconde, avait des *Leishmania* en grand

(1) Delanoe, *Ann. Inst. Pasteur*, 1912, t. XXVI, p. 172. — Fr. Scordo, *Malaria e malattie dei paesi caldi*, septembre-octobre 1912.

(2) A. Laveran et C. Nicolle, *Rapport au XVIIe Congrès internat. de médecine*, Londres, 1913, XXIe section.

(3) C. Nicolle, *Acad. des Sciences*, 2 mars 1908, et *Soc. de path. exotique*, 11 mars 1908. — C. Nicolle et C. Comte, *Ann. Inst. Pasteur de Tunis*, 1908, fasc. IV. — C. Nicolle, *Ann. Inst. Pasteur*, 1909, t. XXIII, p. 447.

nombre dans la moelle osseuse, non rares dans la rate, rares dans le foie. Depuis lors, de nombreux observateurs ont constaté qu'il était facile, en effet, d'inoculer le kala-azar au chien.

Le procédé de choix consiste à injecter le virus dans le foie du chien.

Avec des produits provenant de l'enfant, de singes ou d'autres chiens, C. Nicolle a inoculé 19 chiens qui, à une exception près, se sont tous infectés; la dose de virus injectée a varié de 2 à 4 cent. cubes d'une émulsion assez épaisse.

Sur 30 chiens inoculés par moi, avec la pulpe d'organes contenant des *Leishmania* en grand nombre ou en assez grand nombre, 26 se sont infectés; 4 fois seulement les résultats ont été négatifs (1).

Les jeunes chiens s'infectent en général plus facilement que les chiens adultes ou vieux; cependant, il m'est arrivé d'avoir des insuccès chez de jeunes chiens et de réussir, au contraire, à infecter de vieux chiens (Obs. 8 et 25).

Sur 9 chiens inoculés par Jemma, di Cristina et Cannata, 5 seulement se sont infectés (2).

P. da Silva a inoculé avec succès le virus humain au chien et il a obtenu ensuite des passages de chien à chien (3).

Les inoculations sous-cutanées donnent des résultats négatifs (4).

Novy a réussi à infecter 6 chiens en leur inoculant, dans le péritoine, des cultures de la *L. infantum* (5). Une seule injection du liquide de condensation recueilli dans une vingtaine de tubes de culture a suffi pour produire une infection, tardive à la vérité, chez le chien.

De 4 chiens que j'ai inoculés dans le foie avec des cultures de la *L. infantum*, 3 se sont infectés (Obs. 6 et 7, un troisième chien, mort de complication 7 jours après l'inoculation, avait des *Leishmania* dans la rate et dans la moelle osseuse).

(1) A. Laveran et C. Nicolle, *Rapport* déjà cité *au XVIIe Congrès international de médecine*, Londres, 1913.

(2) R. Jemma, G. di Cristina et S. Cannata, *La Pediatria*, 1910.

(3) P. da Silva, *Arq. do Inst. Camara Pestana*, juin 1914.

(4) C. Nicolle et L. Manceaux, *Arch. Inst. Pasteur de Tunis*, 1910, fasc. III, p. 107.

(5) F.-G. Novy, *Jl. of americ. med. Assoc.*, 24 octobre 1908, p. 1423 et *Soc. de path. exotique*, 21 juillet 1909.

Les inoculations faites dans le foie paraissent donner de meilleurs résultats que celles qui sont faites dans le péritoine.

Salvatore a inoculé sans succès 10 jeunes chiens dans le péritoine avec des cultures de la *L. infantum* (1).

Il est toujours nécessaire d'employer de fortes doses de cultures, et les cultures paraissent devenir de moins en moins actives à mesure qu'elles subissent un plus grand nombre de passages *in vitro*.

W.-L. Yakimoff et Mme Yakimoff ont réussi à infecter 2 chiens par inoculation intraveineuse du liquide des cultures de la *L. infantum*; un des chiens n'avait reçu que 4 cent. cubes de ce liquide (2).

C. Nicolle et L. Blaizot ont inoculé avec succès 2 très jeunes chiens par la voie intraveineuse; chacun des chiens avait reçu, dans la jugulaire externe, le liquide provenant de 15 cultures. L'un des chiens, sacrifié 72 jours après l'inoculation, avait une infection généralisée assez forte (3).

Chez des chiens moins jeunes que ceux employés par Nicolle et Blaizot dans cette expérience, l'inoculation est plus facile dans la saphène externe que dans la jugulaire externe.

J'espérais qu'au moyen de passages successifs par chiens, et en employant de fortes doses de virus, je réussirais à obtenir des infections de plus en plus graves et rapides; il n'en a rien été, mon virus a été en s'affaiblissant et, après le 6e passage par chien, je l'ai perdu.

Le chacal est aussi sensible que le chien à la *L. infantum* (4).

Symptômes. Evolution de l'infection. — La leishmaniose expérimentale est souvent latente chez le chien, comme la leishmaniose naturelle, et pour constater son existence, on n'a d'autre ressource que de rechercher les *Leishmania*.

L'amaigrissement est le symptôme le moins rare; sur 26 chiens inoculés par moi avec succès, 9 étaient amaigris au moment de la mort et parfois l'amaigrissement était très

(1) D. Salvatore, *Malaria e malattie dei paesi caldi*, janvier-février 1914.
(2) W.-L. Yakimoff et Nina K. Yakimoff, *Soc. de path. exotique*, 12 juin 1912.
(3) C. Nicolle et L. Blaizot, *Soc. de path. exotique*, 13 novembre 1912.
(4) C. Nicolle et L. Blaizot, *Soc. de path. exotique*, 13 novembre 1912.

marqué; 1 chien de 8 kilogrammes ne pesait plus que 5 kilogrammes (Obs. 4); 1 chien de 11 kil. 500 ne pesait que 8 kil. 400 (Obs. 5); 1 chien de 10 kilogrammes était tombé à 7 kilogrammes (Obs. 9).

Nicolle a noté, chez un chien infecté, un amaigrissement subit et rapide avec hypothermie suivie bientôt de mort.

Le nombre des chiens infectés de leishmaniose qui augmentent de poids est plus grand que celui des chiens qui diminuent de poids, surtout s'il s'agit de chiens bien nourris et de jeunes animaux dont la croissance continue, ce dont il faut tenir compte.

Au début de l'infection, il se produit quelquefois de petites poussées fébriles qui ne sont appréciables qu'au thermomètre (C. Nicolle).

L'anémie est peu marquée.

On observe parfois, à la dernière période de l'infection, de la paralysie ou de la parésie du train postérieur. Sur 26 chiens infectés, j'ai noté une fois de la paralysie du train postérieur (Obs. 1). C. Nicolle a observé, dans un cas, une paralysie progressive, mortelle.

Un de mes chiens a présenté une kératite double qui a persisté jusqu'à la mort qui n'est survenue que 456 jours après l'inoculation (Obs. 5). C. Nicolle a observé la même complication sur 2 chiens. On a vu précédemment que la kératite, suivie de l'opacité plus ou moins complète des cornées, avait été notée dans la leishmaniose canine naturelle.

La néphrite est souvent signalée dans les observations des chiens infectés par la *L. infantum*, mais cette affection, banale chez les chiens, surtout chez les chiens âgés, paraît étrangère à la leishmaniose.

Un de mes chiens a subi la splénectomie au cours de l'infection (Obs. 6), cette opération ne paraît pas avoir eu d'influence sur la marche de la maladie; Nicolle et Comte avaient déjà constaté le fait.

Le tableau clinique de l'infection produite par la *L. infantum* chez le chien est en somme le même que celui de la leishmaniose naturelle.

L'évolution de la maladie est parfois assez rapide. Un chien inoculé par moi, et sacrifié 67 jours après l'inoculation, avait

une infection d'intensité moyenne; un autre chien, mort accidentellement 55 jours après l'inoculation, avait une infection assez forte. Les ensemencements de la rate et de la moelle osseuse d'un chien mort de complication, 7 jours après l'inoculation, ont donné de belles cultures. C. Nicolle a constaté la présence de *Leishmania* dans le foie d'un chien sacrifié 15 jours après l'inoculation.

En général, l'évolution de la leishmaniose canine est lente; la maladie peut se terminer par la mort ou par la guérison.

Dans 5 cas où la maladie s'est terminée naturellement par la mort, la durée moyenne a été de 257 jours (minimum 200 jours; maximum, 320 jours). Des chiens sacrifiés, en bon état, au 454e jour et au 456e jour après l'inoculation, ont été trouvés encore infectés, mais en voie de guérison (rate petite, fibreuse, *Leishmania* très rares).

Un chien de C. Nicolle était encore infecté 14 mois après l'inoculation.

Une première atteinte de leishmaniose procure l'immunité, à condition que la guérison soit complète et remonte à plusieurs mois; au contraire, une première atteinte sensibilise l'animal s'il est réinoculé avant guérison complète (1).

Je résume les observations de 25 chiens inoculés avec succès, le premier à Tunis par C. Nicolle, les autres par moi à l'Institut Pasteur.

1° Un chien griffon, inoculé de kala-azar, par M. C. Nicolle, m'est remis à l'Institut Pasteur le 23 janvier 1909. L'inoculation remonte à 3 mois environ; des *Leishmania* ont été vues dans le produit d'une ponction du foie, faite au mois de janvier. — 28 janvier, le chien pèse 4 kil. 500. — 24 avril 1909, le chien est très malade, il est amaigri et présente de la parésie du train postérieur; il est sacrifié.

Le chien pèse 4 kilogrammes; la rate pèse 15 grammes. L'augmentation de volume de la rate est la seule lésion appréciable. On trouve des *Leishmania* en grand nombre dans les frottis de rate et de moelle osseuse, plus rares dans les frottis du foie.

2° Un jeune chien est inoculé, le 27 mars 1909, avec la pulpe de la rate d'un singe infecté de kala-azar tunisien. Une ponction du foie faite le 30 avril révèle l'existence de *Leishmania* non rares. Le chien est sacrifié le 6 mai 1909, 40 jours après l'inoculation.

(1) C. Nicolle, *Soc. de path. exotique*, 13 juillet 1910. — C. Nicolle et C. Comte, *Arch. Inst. Pasteur de Tunis*, 1910, fasc. III, p. 103.

Poids du chien : 8 kil. 650. Poids de la rate : 15 grammes. Poids du foie : 478 grammes. La moelle osseuse est rouge, diffluente. *Leishmania* rares dans le foie, dans la rate et dans la moelle osseuse.

3° Un chien adulte, pesant 9 kilogrammes, est inoculé le 27 mars 1909 dans les mêmes conditions que le précédent. Une ponction du foie, faite le 21 mai 1909, ne décèle pas l'existence de *Leishmania*. Le chien meurt accidentellement le 3 juin 1909, 68 jours après l'inoculation.

Le chien pèse 9 kil. 500. La rate pèse 17 grammes. Les autres viscères ne présentent pas d'altérations macroscopiques *Leishmania* non rares dans la moelle osseuse, rares dans la rate et le foie. Des ensemencements faits, dans le milieu de Novy simplifié, avec la rate, le foie et la moelle osseuse donnent de belles cultures.

4° Un chien griffon, adulte, pesant 8 kilogrammes, reçoit le 3 juin 1909, dans le foie, 10 cent. cubes d'une émulsion de pulpe de rate, de foie et de moelle osseuse du chien qui fait l'objet de l'observation 3. — Des ponctions du foie faites les 3 juillet, 29 août et 8 octobre ne décèlent pas l'existence de *Leishmania*. Cependant, le chien maigrit ; le 16 octobre, il ne pèse plus que 6 kil. 500. — Le chien est trouvé mort le 20 décembre 1909, 200 jours après l'inoculation.

Poids du chien : 5 kilogrammes. Poids de la rate : 23 grammes. La consistance de la rate est augmentée ; foie cirrhotique, lobulé, jaunâtre ; reins granuleux (néphrite interstitielle), urine albumineuse. *Leishmania* nombreuses dans la rate et la moelle osseuse, moins nombreuses dans le foie. Les ensemencements faits avec la rate et la moelle osseuse donnent de belles cultures.

5° Un chien adulte, pesant 11 kil. 500, est inoculé le 3 juin 1909, dans le foie, avec 10 cent. cubes de l'émulsion de pulpe de rate, de foie et de moelle osseuse du chien qui fait l'objet de l'observation 3. — Des ponctions du foie faites les 3 juillet, 29 août, 8 et 16 octobre ne révèlent pas l'existence de *Leishmania*. — 16 octobre, le chien pèse 11 kilogrammes. — 2 décembre, la ponction d'un des fémurs donne 10 cent. cubes de sang. L'examen histologique du sang est négatif, mais 1 tube du milieu de Novy simplifié, sur 6 qui ont été ensemencés avec le sang, donne une culture de *Leishmania*.

Le chien pèse, le 21 décembre, 11 kilogrammes ; le 22 février 1910, 13 kil. 300 ; le 22 mars, 12 kil. 900 ; le 4 avril, 13 kilogrammes. On constate, le 4 avril, que les cornées sont troubles. — Le chien maigrit ; il pèse, le 7 juillet, 11 kilogrammes, le 12 août, 10 kilogrammes. Mort le 2 septembre 1910, 456 jours après l'inoculation.

Le chien ne pèse plus que 8 kil. 400. L'émaciation est donc extrême. La rate, très grosse, pèse 55 grammes. Foie gras. Néphrite, urines fortement albumineuses. Cœur et poumons à l'état normal. Moelle osseuse rouge. Cornées très troubles. *Leishmania* très rares dans la rate et dans le foie. L'examen de la moelle osseuse est négatif.

6° Une jeune chienne reçoit, à quatre reprises, dans le péritoine, dans le foie ou dans le tissu conjonctif sous-cutané, des injections de belles cultures de la *L. infantum*. Une de ces injections faite dans le foie est de 10 cent. cubes, les autres sont de 2 à 6 cent. cubes. Les inoculations sont faites aux dates suivantes : 11 et 26 août, 12 octobre 1909 et 11 janvier 1910. —

Deux tubes du milieu de Novy simplifié, ensemencés le 31 janvier 1910 avec le produit d'une ponction du foie, donnent de belles cultures de *Leishmania*. — La chienne pèse, le 21 décembre 1909, 10 kilogrammes; le 22 février 1910, 11 kilogrammes; le 23 mars, 13 kil. 500.

Le 9 mai 1910, on pratique la splénectomie. La rate, très hypertrophiée, pèse 135 grammes; elle est ramollie. *Leishmania* assez rares dans les frottis de rate.

La chienne maigrit; le 1er juin, elle pèse 12 kil. 600; le 20 juin et le 1er juillet, 11 kilogrammes. Elle est sacrifiée en mauvais état, le 23 août 1910, 381 jours après la première inoculation.

Les ganglions inguinaux et axillaires sont fortement augmentés de volume (hypertrophie compensatrice de la splénectomie?). Gros reins blancs, urines fortement albumineuses. Les autres viscères ne présentent pas d'altération macroscopique. Moelle osseuse rouge, diffluente. *Leishmania* en assez grand nombre dans les frottis de moelle osseuse, et des ganglions lymphatiques, plus rares dans les frottis du foie.

7° Un jeune chien, pesant 2 kil. 200, reçoit le 30 novembre 1909, dans la moelle du fémur droit, 1 cent. cube de belle culture de la *L. infantum*; il reçoit en outre dans le foie, à 3 reprises, le 15 décembre 1909 et les 5 et 11 janvier 1910, des injections de cultures en milieu liquide de la même *Leishmania*; chaque injection est de 10 cent. cubes. Le chien pèse, le 21 décembre, 3 kil. 800; le 20 janvier 1910, 4 kil. 500; le 22 février, 5 kil. 700; le 22 mars, 5 kil. 800. Deux tubes de culture sont ensemencés, le 16 février, avec le produit de ponctions du foie et d'une côte; le résultat est négatif. Le chien est trouvé mort le 11 avril 1910, 132 jours après la première inoculation.

Le chien pèse 4 kil. 800, la rate pèse 5 grammes; elle n'est pas augmentée de volume, sa consistance est normale. Les reins présentent les caractères macroscopiques de la néphrite. L'examen histologique des frottis de rate, de foie et de moelle osseuse ne révèle pas l'existence de *Leishmania*, mais un tube ensemencé avec la rate donne, à la date du 26 avril, une culture caractéristique; 3 tubes ensemencés avec le foie et la moelle osseuse restent stériles.

8° Un vieux chien pesant 10 kilogrammes reçoit le 20 décembre 1909, dans le foie, 10 cent. cubes du produit du broyage du foie, de la rate et de la moelle osseuse du chien qui fait l'objet de l'observation 4. — 19 janvier 1910, le chien pèse 10 kilogrammes. — Le chien meurt le 23 janvier 1910, 34 jours après l'inoculation.

Le chien pèse 9 kil. 900. La rate fortement hypertrophiée pèse 40 grammes; son parenchyme est diffluent. Foie congestionné. Reins scléreux. Moelle osseuse jaunâtre, graisseuse. L'examen histologique de la rate, du foie et de la moelle osseuse ne révèle pas l'existence de *Leishmania*, mais 4 tubes ensemencés avec la rate et 2 tubes ensemencés avec la moelle osseuse donnent des cultures caractéristiques; 2 tubes ensemencés avec le foie restent stériles.

9° Un chien adulte, pesant 10 kilogrammes, reçoit le 20 décembre 1909, dans le foie, 10 cent. cubes du produit du broyage du foie, de la rate et de la moelle osseuse du chien qui fait l'objet de l'observation 4. — Des ponctions du foie faites les 31 janvier et 10 juin 1910 ne révèlent pas l'existence de *Leishmania*. Les tubes de culture ensemencés avec les produits de

ces ponctions restent stériles. — Le chien pèse, le 12 février, 9 kil. 500; le 22 mars, 11 kilogrammes; le 12 août, 9 kilogrammes. — 23 août 1910, le chien reçoit, dans le foie, 20 cent. cubes de pulpe du foie de la chienne qui fait l'objet de l'observation 6. — Le chien pèse, le 1er septembre, 9 kil. 600; le 1er novembre, 7 kil. 500, il a donc beaucoup maigri à cette date. Le produit d'une ponction du foie faite le 14 octobre, ensemencé, donne une culture caractéristique. Le chien meurt le 5 novembre 1910, 320 jours après la première inoculation, 74 jours après la deuxième.

Le chien pèse 7 kilogrammes. La rate, fortement hypertrophiée, pèse 43 grammes. Altérations macroscopiques de la néphrite interstitielle et de l'hépatite. Moelle osseuse rouge. *Leishmania* nombreuses dans les frottis de rate, de foie et de moelle osseuse.

10° Une chienne, pesant 4 kil. 300, reçoit, les 22 et 26 mars, 4, 14 et 18 avril 1910, dans le foie ou dans le tissu conjonctif sous-cutané, 5 injections (de 10 cent. cubes chaque) de culture de la *Leishmania infantum* en milieu liquide. — Le 30 avril, on ensemence 2 tubes du milieu de Novy simplifié avec le produit d'une ponction du fémur et, le 19 juillet, 2 tubes avec le produit d'une ponction du foie; les 4 tubes restent stériles. — Le 25 juillet, on ensemence 2 tubes avec le produit d'une ponction du fémur, l'un des tubes reste stérile, l'autre donne une belle culture de flagellés. Le 23 août 1910, on réinocule la chienne afin de voir si la marche de l'infection pourra être accélérée; on injecte, dans le foie, 20 cent. cubes de la pulpe du foie de la chienne qui fait l'objet de l'observation 6. La chienne meurt le 5 novembre 1910, elle pèse 6 kil. 100. La rate, fortement hypertrophiée, pèse 43 grammes. Les reins présentent les altérations caractéristiques de la néphrite interstitielle chronique, et le foie celles de l'hépatite (cirrhose). L'examen des frottis de rate et de moelle osseuse révèle l'existence de *Leishmania* rares.

11° Un chien, pesant 3 kilogrammes, reçoit, à trois reprises, sous la peau ou dans le foie, les 22 et 26 mars et 4 avril 1910, 10 cent. cubes de culture de la *L. infantum* en milieu liquide. — Le chien pèse, le 10 juin, 5 kil. 300; le 19 juillet, 7 kilogrammes. — Des ponctions du fémur et du foie, faites les 10 juin, 19 juillet et 10 août, donnent des résultats négatifs à l'examen histologique et aux essais de culture. — 23 août 1910, le chien reçoit, dans le foie, 20 cent. cubes de pulpe du foie de la chienne qui fait l'objet de l'observation 6. — Le 1er septembre, le chien pèse 7 kil. 500 et le 1er octobre, 8 kil. 300. — 26 octobre, le produit d'une ponction du fémur donne à l'ensemencement des flagellés. Le chien meurt le 28 novembre 1910, 251 jours après la première inoculation, 97 jours après l'inoculation de pulpe de rate, qui paraît avoir donné lieu à l'infection.

Le chien pèse 7 kil. 500. La rate pèse 14 grammes. Légère hypertrophie des ganglions iliaques. Broncho-pneumonie. *Leishmania* très nombreuses dans les frottis de rate et de moelle osseuse; nombreuses dans les frottis du foie.

12° Une chienne adulte, pesant 6 kil. 300, reçoit le 9 mai 1910, dans le foie, 10 cent. cubes de la pulpe splénique d'une chienne, objet de l'observation 6, qui a été splénectomisée et qui est infectée de kala-azar tunisien; le 10 mai, nouvelle injection dans le péritoine, de la même pulpe qui a été conservée à la glacière. — 19 juillet, la chienne pèse 6 kil. 300; une ponction du foie ne révèle pas l'existence de *Leishmania*; il en est de même d'une ponction du

fémur faite le 10 août. — 15 septembre, on injecte dans le foie 10 cent. cubes d'une belle culture de la *L. infantum*. — 22 décembre 1910, la chienne, qui est amaigrie et affaiblie, est sacrifiée, 227 jours après la première inoculation.

La chienne pèse 5 kil. 600. La rate, qui est hypertrophiée, pèse 22 grammes. Les autres viscères ne présentent pas de lésions macroscopiques. *Leishmania* très nombreuses dans la moelle osseuse, assez nombreuses dans la rate, rares dans le foie.

13° Un chien adulte, pesant 6 kil. 100, reçoit le 10 mai 1910, dans le foie et dans le péritoine, 20 cent. cubes de pulpe de rate de la chienne qui fait l'objet de l'observation 6 (splénectomie du 9 mai). — 10 août, une ponction du fémur ne révèle pas, à l'ensemencement, l'existence de *Leishmania*. — 15 septembre, on injecte, dans le foie, 10 cent. cubes de culture de *L. infantum* en milieu liquide. — Le chien pèse, le 15 octobre, 7 kilogrammes et, le 15 novembre, 7 kil. 300. — 8 décembre, le produit d'une ponction du fémur donne, à l'ensemencement, une belle culture de flagellés. — 10 décembre, le chien pèse 6 kil. 200. On injecte encore, dans le péritoine, 10 cent. cubes de culture de *L. infantum*, dans le but d'obtenir une forte infection. L'animal amaigri, affaibli, est sacrifié le 21 janvier 1911, 256 jours après la première inoculation. Le chien pèse 6 kil. 400. La rate pèse 11 grammes; sa consistance est augmentée. Foie gros, congestionné. Néphrite légère, urine albumineuse. *Leishmania* rares dans la moelle osseuse, très rares dans la rate : examen de frottis du foie négatif.

14° Un chien adulte, pesant 10 kilogrammes, reçoit le 23 août 1910, dans le foie, 25 cent. cubes de la pulpe du foie de la chienne qui fait l'objet de l'observation 6. — Le chien pèse, le 1er octobre, 10 kilogrammes ; le 1er novembre, 9 kil. 700. — 5 novembre, le chien reçoit, dans le foie, 5 cent. cubes d'émulsion, après broyage, du foie et de la rate du chien qui fait l'objet de l'observation 9. — 15 novembre, le chien pèse 9 kil. 800. Une ponction du fémur est faite le 16 novembre, le produit ensemencé donne de belles cultures de *Leishmania*, au 17e jour. — 11 décembre, injection intrapéritonéale de 10 cent. cubes de culture de *L. infantum*. — Le chien, qui est en mauvais état, est sacrifié le 24 janvier 1911; il pèse 9 kil. 300. La rate, hypertrophiée, pèse 28 grammes. Reins congestionnés. Urine albumineuse. *Leishmania* très rares dans la rate et dans la moelle osseuse. Examen de frottis du foie négatif.

15° Un jeune chien, pesant 5 kil. 100, reçoit le 5 novembre 1910, dans le foie, 5 cent. cubes de pulpe de foie et de rate du chien qui fait l'objet de l'observation 9. — Le 15 novembre, le chien pèse 6 kil. 200 et, le 11 janvier 1911, 5 kil. 400. Le chien, qui est malade, est sacrifié le 11 janvier, 67 jours après l'inoculation. La rate pèse 14 grammes. On constate l'existence de plusieurs foyers de pneumonie. *Leishmania* nombreuses dans la moelle osseuse, très rares dans les frottis de rate. L'examen d'un frottis du foie est négatif

16° Un chien adulte, pesant 8 kil. 300, reçoit le 28 novembre 1910, dans le foie, 10 cent. cubes d'émulsion, après broyage, de la rate et de la moelle osseuse du chien qui fait l'objet de l'observation 11. — Le chien pèse, le 16 décembre 1910, 10 kil. 500; le 15 janvier 1911, 12 kil. 500; le 6 mars, 12 kil. 700. Le chien meurt le 10 mars 1911, 108 jours après l'inoculation; il pèse 9 kil. 800. La rate, de consistance normale, pèse 21 grammes. Reins

marbrés, néphrite probable. Moelle osseuse rouge, non diffluente. *Leishmania* non rares dans les frottis de rate, très rares dans les frottis de moelle osseuse. L'examen d'un frottis du foie est négatif.

17° Un chien adulte, pesant 4 kil. 800, reçoit le 22 décembre 1910, dans le péritoine, 10 cent. cubes de pulpe de rate de la chienne qui fait l'objet de l'observation 12. — Le chien pèse : le 15 janvier 1911, 4 kil. 700; le 1er février, 5 kilogrammes; le 6 mars et le 1er avril, 5 kilogrammes; le 15 juin, 6 kilogrammes. — Le 21 janvier 1911, un des fémurs est ponctionné, l'examen histologique ne révèle pas l'existence de *Leishmania*, mais, à l'ensemencement, on obtient une culture caractéristique. Le chien est sacrifié le 19 août 1911, 240 jours après l'inoculation; il pèse 5 kil. 300. La rate pèse 9 grammes, sa consistance est augmentée, la capsule est épaissie. *Leishmania* rares dans la moelle osseuse, très rares dans la rate. L'examen d'un frottis du foie est négatif. L'état de la rate et la rareté des *Leishmania* dans ce viscère indiquent que l'infection était en voie de guérison.

18° Un jeune chien, pesant 3 kil. 200, reçoit le 24 janvier 1911, dans le péritoine, 5 cent. cubes de la pulpe de rate et de moelle osseuse du chien qui fait l'objet de l'observation 14. — Le chien pèse : le 1er février, 4 kil. 300; le 6 mars, 5 kil. 700; le 3 mai, 5 kil. 800; le 1er juin et le 2 août, 6 kil. 600. Le chien, qui est en bon, état est sacrifié le 2 septembre 1911, 221 jours après l'inoculation; il pèse 6 kil. 400; la rate, hypertrophiée, pèse 17 grammes. Les autres viscères ne présentent aucune altération macroscopique. *Leishmania* non rares dans la rate et dans la moelle osseuse; l'examen de frottis du foie est négatif.

19° Un jeune chien, pesant 2 kil. 470, reçoit le 4 janvier 1911, dans le péritoine, 2 cent. cubes de la pulpe de rate et de moelle osseuse du chien qui fait l'objet de l'observation 14. — Le chien pèse : le 6 mars, 3 kil. 300; le 3 mai, 3 kil. 700; le 1er juin, 4 kil. 300; il est trouvé mort le 19 juin 1911, 146 jours après l'inoculation. Le chien pèse 4 kil. 200; la rate, augmentée de volume, pèse 15 gr. 50. Foie d'aspect normal. Reins pâles présentant les altérations de la néphrite épithéliale; urine fortement albumineuse. Organes thoraciques à l'état normal. *Leishmania* non rares dans la moelle osseuse, très rares dans la rate. L'examen de frottis du foie est négatif.

20° Un jeune chien, pesant 5 kilogrammes, reçoit le 16 mars 1911, dans le foie, 4 cent. cubes de pulpe de rate et de foie du chien qui fait l'objet de l'observation 16. Le chien pèse : le 1er avril, 5 kilogrammes; le 3 mai, 5 kil. 700; le 1er juin, 6 kil. 500; le 1er juillet, 7 kil. 100; le 2 août, 7 kil. 200. — 2 sept. 1911, le chien est réinoculé, dans le foie, avec la pulpe de rate et de moelle osseuse du chien qui fait l'objet de l'observation 18. — Le 4 octobre, le chien pèse 8 kil. 500; il est sacrifié, en bon état, le 26 octobre 1911, 224 jours après la première inoculation. Le chien pèse 9 kil. 500; la rate, notablement hypertrophiée, pèse 42 grammes, sa consistance est augmentée. Les autres viscères ne présentent pas d'altérations macroscopiques. *Leishmania* non rares dans la moelle osseuse, rares dans la rate; l'examen de frottis du foie est négatif.

21° Une chienne adulte, pesant 5 kilogrammes, est inoculée le 2 septembre 1911, dans le foie, avec la pulpe de rate et la moelle osseuse du chien qui fait l'objet de l'observation 18. — La chienne pèse, le 4 octobre, 5 kil. 500;

elle meurt le 27 octobre à la suite d'une nouvelle inoculation intrapéritonéale faite le 26 octobre. La chienne pèse 5 kil. 200; la rate pèse 35 grammes. *Leishmania* nombreuses dans la moelle osseuse, rares dans la rate. L'examen de frottis du foie est négatif.

22° Un jeune chien, pesant 6 kil. 500, est inoculé le 26 octobre 1911, dans le foie, avec 5 cent. cubes de la pulpe de rate et de la moelle osseuse du chien qui fait l'objet de l'observation 18. — Le chien pèse, le 15 novembre, 6 kil. 800; le 18 décembre, 8 kil. 400; le 2 janvier 1912, 11 kilogrammes. A l'examen du sang je constate l'existence de *Leishmania* très rares. Le chien est sacrifié, en bon état, le 25 janvier 1912, 91 jours après l'inoculation. Le chien pèse, 11 kil. 700: la rate pèse 25 grammes. Le foie a son aspect normal, ainsi que les autres viscères. *Leishmania* nombreuses dans la moelle osseuse, non rares dans la rate, très rares dans le foie.

23° Une chienne adulte, pesant 8 kil. 200, reçoit le 25 janvier 1912, dans le foie, 5 cent. cubes environ de la pulpe de rate, de foie et de la moelle osseuse du chien qui fait l'objet de l'observation 22. — La chienne pèse : le 1er février, 8 kil. 300 et le 2 mars, 8 kil. 400. — La chienne est sacrifiée, en bon état, le 27 avril, 93 jours après l'inoculation. La chienne pèse 8 kilogrammes. Il existe deux rates principales, parfaitement indépendantes l'une de l'autre, qui pèsent l'une 27 grammes et l'autre 32 grammes; on distingue en outre, dans le grand épiploon, des corps brunâtres de la grosseur de grains de chènevis qui constituent évidemment de petites rates accessoires. Les autres viscères ont l'aspect normal. *Leishmania* très rares dans la rate et la moelle osseuse. La moelle osseuse ensemencée dans deux tubes du milieu de Novy simplifié donne de belles cultures.

24° Une chienne adulte, pesant 7 kil. 100, reçoit le 25 janvier 1912, dans le foie, 5 cent. cubes environ de la pulpe de rate et de moelle osseuse du chien qui fait l'objet de l'observation 22. — La chienne pèse : le 26 mars, 8 kil. 700 et le 27 avril, 8 kil. 200. — La chienne est sacrifiée, en bon état, le 17 mai 1912, 113 jours après l'inoculation; elle pèse 10 kilogrammes; la rate, hypertrophiée, pèse 37 grammes. Les autres viscères ont l'aspect normal. *Leishmania* rares dans les frottis de rate.

25° Un vieux chien, pesant 4 kil. 300, est inoculé le 17 mai 1912, dans le foie, avec la pulpe de rate du chien qui fait l'objet de l'observation 24. — Le chien est sacrifié le 31 juillet 1912, 75 jours après l'inoculation, il pèse 4 kil. 500. La rate pèse 18 grammes, sa consistance est augmentée. Les autres viscères ont l'aspect normal. Moelle osseuse jaune, graisseuse. *Leishmania* non rares dans la rate; deux tubes ensemencés avec la rate donnent de belles cultures.

Anatomie pathologique. — La rate est presque toujours augmentée de volume ; j'ai trouvé pour 27 chiens, du poids moyen de 7 kil. 24, un poids moyen de la rate de 28 grammes, notablement supérieur au poids normal (1). Chez quelques chiens,

(1) D'après Ellenberger et Baum, le poids de la rate du chien normal est de 1 p. 500 à 1 p. 600 du poids du corps; dans le cas particulier, le poids de la rate de chiens normaux n'aurait pas dû dépasser 14 gr. 48.

l'hypertrophie de la rate était très marquée. Un chien de 13 kilogrammes, qui a subi la splénectomie, avait une rate pesant 135 grammes (Obs. 6) ; un chien, de 8 kil. 400, avait une rate de 55 grammes ; un chien, de 7 kilogrammes, une rate de 43 grammes ; un chien, de 5 kil. 200, une rate de 35 grammes ; un chien, de 8 kilogrammes, avait 2 rates pesant l'une 27 gr., l'autre 32 grammes, 59 grammes en tout (Obs. 23).

Chez les chiens qui sont au début ou à la période d'état de la maladie, la consistance de la rate est d'ordinaire diminuée ; chez les chiens qui meurent de complications ou qui sont sacrifiés alors que la leishmaniose est guérie ou en voie de guérison, la rate est petite et de consistance fibreuse.

Chez le chien splénectomisé qui avait survécu plus de 3 mois à l'opération, les ganglions, notamment les inguinaux et les axillaires étaient fortement hypertrophiés.

La moelle osseuse est souvent rouge et diffluente.

Le foie présente son aspect normal.

Les reins sont souvent malades chez les chiens âgés, mais les lésions de néphrite sont banales dans ce cas.

Les organes thoraciques sont presque toujours à l'état sain. Chez un chien, mort de leishmaniose, C. Nicolle a noté des hémorragies ou infarctus dans les poumons, des épanchements séro-fibrineux dans le péritoine, les plèvres et le péricarde.

C'est dans la moelle osseuse et ensuite dans la rate, qu'on trouve les *Leishmania* en plus grand nombre ; cette règle comporte toutefois quelques exceptions (Obs. 5 et 16) ; le foie est d'ordinaire beaucoup moins parasité ; il arrive souvent qu'on ne voit pas de *Leishmania* dans les frottis du foie, alors qu'elles sont assez nombreuses dans les frottis de moelle osseuse ou de rate.

Sur 25 chiens infectés de leishmaniose expérimentale, j'ai trouvé que les parasites étaient répartis de la manière suivante :

Moelle osseuse : *Leishmania* nombreuses, 8 fois ; non rares, 6 fois ; rares ou très rares, 9 fois. L'examen histologique a été négatif 2 fois ; il a porté dans ces cas sur des os de vieux chiens dont la moelle osseuse était jaune, tout à fait graisseuse.

Rate : *Leishmania* nombreuses, 4 fois ; non rares, 5 fois ; rares ou très rares, 16 fois.

Foie : *Leishmania* nombreuses, 1 fois ; non rares, 4 fois ; rares

ou très rares, 8 fois. 12 fois l'examen histologique des frottis du foie a été négatif.

Dans les ganglions lymphatiques, on trouve souvent des *Leishmania*; ces parasites étaient assez nombreux dans les ganglions lymphatiques fortement hypertrophiés du chien ayant subi la splénectomie dont il a été question déjà.

Dans les frottis, les *Leishmania* sont souvent libres, ce qui s'explique par la destruction artificielle d'un grand nombre d'éléments distendus par les parasites et très fragiles. Sur les coupes, on constate que la plupart des *Leishmania* sont endocellulaires. Les parasites se trouvent en nombre variable dans des leucocytes mononucléaires (rarement dans des polynucléaires), dans des cellules endothéliales et, parfois, dans les cellules hépatiques. Un même leucocyte, fortement distendu, peut contenir de 60 à 80 *Leishmania*.

Nous n'avons pas à décrire ici la *Leishmania infantum* qui est bien connue.

Diagnostic. Pronostic. — Ce que nous avons dit précédemment à propos du diagnostic de la leishmaniose naturelle du chien s'applique au diagnostic de la leishmaniose produite expérimentalement par la *L. infantum*; les procédés employés dans les deux cas pour déceler l'existence des parasites sont les mêmes. On remarquera que chez plusieurs des chiens dont les observations sont résumées plus haut, l'examen histologique des produits de ponctions du foie ou même de la moelle osseuse a donné des résultats négatifs, alors que l'ensemencement de ces produits fournissait la preuve de l'existence des *Leishmania* (Obs. 5, 8, 17).

Dans un seul cas, l'existence de *Leishmania* a été notée à l'examen direct du sang (Obs. 22); mais je dois dire que j'ai eu recours trop rarement à ce moyen de diagnostic.

La leishmaniose provoquée chez le chien par de fortes doses de virus se termine souvent par la mort, mais la terminaison par guérison n'est pas rare. Chez les chiens qui sont sacrifiés, alors que l'infection est en voie de régression, la rate est petite, de consistance plus grande qu'à l'état normal et on ne trouve que des *Leishmania* très rares dans la moelle des os et dans la rate (Obs. 17).

Traitement. — L'impossibilité où l'on a été jusqu'ici d'obtenir, chez le chien, des infections par la *L. infantum* à évolution régulière a rendu impossible l'étude du traitement de ces infections. Dans les cas où des chiens infectés et traités guérissent, on doit toujours se demander si la guérison n'a pas été la conséquence de la marche naturelle de la maladie. Je dois signaler cependant que C. Nicolle et A. Conor ont observé, chez un chien infecté, une guérison rapide à la suite d'une seule injection de salvarsan de 20 centigrammes pour un chien de 10 kil. 900 (1).

Singes. — C. Nicolle, puis C. Nicolle et L. Manceaux ont montré que le *Macacus sinicus* et le *M. cynomolgus* s'infectaient assez facilement lorsqu'on leur inoculait, dans le foie, de la pulpe d'organes d'enfants ou d'animaux atteints de kala-azar méditerranéen (2).

Le procédé d'inoculation préconisé par C. Nicolle est celui qui donne les meilleurs résultats chez le singe, comme chez le chien.

Les inoculations sous-cutanées n'ont jamais donné lieu à des infections généralisées.

Le fait suivant observé par Nicolle et Manceaux (3) mérite d'être rapporté.

Un bonnet chinois inoculé sous la peau de l'avant-bras droit, avec le produit du broyage de la rate d'un singe fortement infecté par *L. infantum*, a présenté une réaction thermique très courte, son bras a enflé et il est resté gros pendant plus de 2 mois. Une ponction, pratiquée au point d'inoculation, 45 jours après l'injection du virus sous la peau, a révélé l'existence de nombreuses *Leishmania*. La rate n'a jamais présenté les signes de l'hypertrophie et quand l'animal est mort d'une autre maladie, après guérison complète de l'affection locale, on n'a trouvé de *Leishmania* ni dans la rate, ni dans le foie, ni dans la moelle des os. Comme le font remarquer Nicolle et Manceaux, la lésion locale provoquée dans ce cas ne ressemblait en rien au bouton d'Orient.

(1) C. Nicolle et A. Conor, *Ann. Inst. Pasteur de Tunis*, 1911, fasc. II, p. 117.
(2) C. Nicolle, *Ann. Inst. Pasteur*, juin 1909, t. XXIII, p. 457. — C. Nicolle et L. Manceaux, *Arch. Inst. Pasteur de Tunis*, juillet 1909, p. 133.
(3) C. Nicolle et L. Manceaux, *Arch. Inst. Pasteur de Tunis*, 1909, fasc. IV, p. 195.

On pourrait croire que la leishmaniose, une fois adaptée à l'organisme du singe, devient plus virulente pour cet animal; il n'en est rien; à la suite des passages de singe à singe, le virus s'affaiblit au contraire rapidement (1).

Sur 7 singes, inoculés par Nicolle à Tunis, 2 ont succombé au kala-azar, 2 ont été sacrifiés en pleine infection, 1 est mort d'une infection étrangère, 2 étaient encore vivants et infectés au moment où cette statistique a été établie; ils ont guéri depuis.

Sur 14 singes appartenant aux espèces : *M. sinicus*, *M. cynomolgus*, *M. rhesus*, inoculés par moi à l'Institut Pasteur, 2 ont eu des infections mortelles (il s'agissait dans les deux cas de *M. cynomolgus*); 7 ont eu des infections légères (*M. sinicus*, 2; *M. cynomolgus*, 4; *M. rhesus*, 1); 5 ne se sont pas infectés (*M. cynomolgus*, 4; *M. rhesus*, 1).

Le *M. rhesus* noté comme ayant eu une infection légère a guéri sans que la présence des *Leishmania* dans le foie ait été constatée, mais l'hypertrophie de la rate qui s'est produite quelque temps après l'inoculation, pour disparaître ensuite, laisse peu de doutes sur la réalité de l'infection.

Marshall, au Soudan, a réussi à infecter 5 *Cercopithecus sabæus*, sur 7 inoculés, avec le virus du kala-azar soudanais qui paraît devoir être identifié au kala-azar méditerranéen (2).

Symptômes. Evolution de l'infection. — Les symptômes de la leishmaniose sont, en général, plus apparents chez le singe que chez le chien.

La fièvre est souvent précoce, ce qui permet de reconnaître le début de l'infection; elle procède par poussées qui alternent avec des périodes d'apyrexie. Dans les cas graves, la fièvre devient continue, pour faire place à une hypothermie finale; dans les cas légers, qui se terminent par guérison, les poussées fébriles s'espacent, puis disparaissent (C. Nicolle).

Avec la fièvre, il faut citer, parmi les symptômes les plus constants de la leishmaniose simienne, l'hypertrophie de la rate. La rate qui, à l'état normal, n'est pas perceptible au

(1) C. Nicolle et L. Manceaux, *Op. cit.*
(2) W.-E. Marshall, *Fourth Rep. Wellcome trop. research Laboratories*, Khartoum, 1911, t. A, p. 164 et *Jl. R. Army med. Corps*, septembre 1911.

palper chez les singes, déborde les fausses côtes chez ceux de ces animaux qui sont infectés de leishmaniose; son extrémité inférieure peut être saisie entre le pouce et l'index; mobile et allongée, cette extrémité de la rate ne doit pas être confondue avec la masse immobile et de forme spéciale du rein gauche.

Tantôt on observe un amaigrissement progressif et la mort survient dans le marasme, tantôt l'état général reste bon; la maladie se termine alors par guérison.

Les singes, comme les enfants infectés de kala-azar, présentent quelquefois des éruptions pétéchiales.

La splénectomie pratiquée au cours de l'infection paraît être sans action sur l'évolution de la maladie.

La durée de la leishmaniose dans les formes graves, terminées par la mort, est de deux à trois mois; dans les formes d'intensité moyenne, elle peut être beaucoup plus longue; des singes inoculés par Nicolle, et infectés, étaient encore vivants six mois après l'inoculation.

Une première atteinte de kala-azar confère une immunité complète au singe, comme au chien (1).

Les observations 1 et 2, résumées ci-après, sont des exemples d'infections fortes, terminées par la mort chez des *Macacus cynomolgus*. La durée de la maladie a été de 59 jours dans le premier cas et de 36 jours seulement dans le deuxième, c'est-à-dire beaucoup plus courte qu'elle ne l'a été chez les chiens; on a vu plus haut que chez 5 chiens qui ont succombé à la leishmaniose expérimentale, la durée moyenne de la maladie a été de 257 jours.

1° Un *Macacus cynomolgus*, pesant 1 kil. 450, est inoculé le 27 janvier 1909, dans le foie, avec la pulpe de rate d'un chien fortement infecté de kala-azar tunisien (infection expérimentale). — 6 mars, le singe pèse 1 kil. 440; la température est de 38°6. La rate est augmentée de volume. — 12 mars, le singe pèse 1 kil. 260; la température est de 38°8. — 19 mars, le singe pèse 1 kil. 320; ta température est de 39°1. Dans le produit d'une ponction du foie, on constate l'existence de *Leishmania* non rares. — 26 mars, le singe ne pèse plus que 1 kilogramme; il a donc sensiblement maigri; il est moins vif qu'à l'ordinaire et la température est seulement de 37°5. — Le singe est trouvé mort le 27 mars. La rate, hypertrophiée, pèse 22 grammes. Le foie pèse 78 grammes. Les autres viscères ont l'aspect normal. *Leishmania* très nom-

(1) C. Nicolle et C. Comte, *Arch. Institut Pasteur Tunis*, 1910, fasc. III, p. 103.

breuses dans la rate, nombreuses dans le foie, assez rares dans la moelle osseuse.

2° *Un Macacus cynomolgus* reçoit le 28 novembre 1910, dans le foie, 5 cent. cubes d'une émulsion de rate et de moelle osseuse d'un chien infecté avec le kala-azar tunisien. — 30 décembre 1910, le singe est amaigri, toujours accroupi au fond de la cage, mange peu. Il est trouvé mort le 3 janvier 1911. — Le singe pèse 1 kil. 600; la rate, hypertrophiée, pèse 18 grammes. Les autres viscères ont l'aspect normal. *Leishmania* non rares dans la moelle osseuse, très rares dans la rate; l'examen d'un frottis du foie est négatif.

Anatomie pathologique. — Les singes, qui succombent à la leishmaniose, présentent constamment de l'hypertrophie de la rate. La rate qui chez un *M. sinicus* normal, de taille moyenne, pèse 3 grammes environ, atteint souvent le poids de 11 et 12 grammes, ou même davantage, chez ceux de ces animaux qui sont infectés. Un *M. sinicus*, inoculé avec succès par C. Nicolle, avait une rate pesant 25 grammes. Le *Macacus cynomolgus* qui fait l'objet de l'observation 1, résumée ci-dessus, ne pesait que 1 kilogramme au moment de la mort, et sa rate pesait 22 grammes. Le *M. cynomolgus* de l'observation 2 pesait 1 kil. 600 et avait une rate de 18 grammes.

Chez les singes qui sont sacrifiés après guérison de la leishmaniose, la rate est petite, globuleuse, de consistance fibreuse. Un *M. sinicus* mort de complication, après guérison d'une infection par la *L. infantum*, avait une rate de consistance fibreuse qui ne pesait que 1 gr. 80; le poids du singe était de 1 kil. 570.

La moelle osseuse est rouge et souvent diffluente.

Les localisations des *Leishmania* sont les mêmes que chez le chien et chez l'enfant; c'est dans la moelle osseuse et dans la rate que l'on trouve les parasites en plus grand nombre; le foie vient ensuite. Les *Leishmania* siègent en général dans les leucocytes ou dans les cellules endothéliales; elles peuvent envahir aussi les cellules hépatiques (C. Nicolle).

Diagnostic. Pronostic. — Ce que nous avons dit plus haut du diagnostic de la leishmaniose canine s'applique ici. Les formes latentes sont communes chez le singe, comme chez le chien, cependant l'hypertrophie de la rate, presque toujours apparente chez le singe, fournit un signe important qui fait défaut chez le chien.

Ici, comme chez le chien, pour porter le diagnostic, il faut

toujours en venir à la recherche des *Leishmania*. La ponction du foie qui donne de bons résultats quand il s'agit d'infections généralisées graves, comme chez le singe qui est l'objet de l'observation 1, est insuffisante dans les cas d'infections légères, comme le prouve l'observation suivante (1).

3° Un *Macacus cynomolgus*, pesant 2 kil. 500, est inoculé le 24 avril 1909 avec du virus provenant d'un chien infecté de leishmaniose. 5 ponctions du foie, pratiquées le 1er juin, les 2 et 30 juillet, le 26 août et le 13 octobre 1909, ne décèlent pas, sur frottis colorés, de *Leishmania*. La rate s'hypertrophie au début de juin, devient dure et volumineuse en juillet-août, et commence à diminuer en octobre. Le 30 octobre, l'animal, qui avait maigri pendant l'été, pèse 2 kil. 580 ; son état est très bon ; il est alors splénectomisé ; la rate pèse 19 grammes ; à la coupe, son parenchyme est résistant, légèrement sclérosé ; un examen prolongé de plusieurs frottis de pulpe splénique, prélevée en deux régions éloignées, ne décèle pas de *Leishmania*. L'ensemencement, en 6 tubes, renfermant du milieu de Novy simplifié, de quantités relativement fortes de pulpe splénique fournit les résultats suivants : 2 tubes stériles ; 2 tubes avec bactéries ; 1 tube avec flagellés et bactéries ; 1 tube avec culture pure, très riche de flagellés libres ou en rosaces volumineuses, repiquables. Le 2 décembre 1909, l'animal pèse 2 kil. 500 et sa santé paraît très bonne.

Ainsi, des ponctions répétées du foie n'ont pas permis, dans ce cas, de constater l'existence des *Leishmania* et des ponctions de la rate n'auraient sans doute pas donné de meilleurs résultats, puisque, après la splénectomie, l'examen de frottis de la rate a été négatif et que l'existence des *Leishmania* n'a été révélée que par les cultures obtenues à la suite des ensemencements faits avec la pulpe splénique.

Marshall (*Op. cit.*) a trouvé 5 fois sur 5 des *Leishmania* dans le sang de cercopithèques infectés avec le virus du kala-azar soudanais, mais les parasites étaient très rares et par suite leur recherche était laborieuse.

L'infection produite par la *L. infantum* chez le singe se termine tantôt par la mort, tantôt par la guérison.

Traitement. — Ici, comme chez le chien, l'irrégularité avec laquelle évoluent les infections dues à la *L. infantum* n'a pas permis d'entreprendre des expériences de traitement.

(1) A. Laveran et A. Pettit, *Bullet. Soc. de path. exotique*, 8 décembre 1909, t. II, p. 585.

Souris. — Laveran et Pettit ont montré, en 1909, que lorsqu'on inocule à des souris ou à des rats, dans la cavité péritonéale ou dans le foie, de la pulpe des viscères d'un animal fortement infecté de kala-azar (virus tunisien), on peut produire chez ces animaux des infections légères qui, localisées à la cavité péritonéale, se terminent par guérison (1). La plupart des souris inoculées n'avaient pas été suivies assez longtemps pour que l'infection eût le temps de se généraliser.

En 1912, Laveran a montré qu'on pouvait produire, chez la souris, des infections généralisées avec le virus du kala-azar tunisien (2).

W.-L. Yakimoff et N. Kohl-Yakimoff ont réussi également à produire des infections généralisées légères chez les souris avec la *Leishmania infantum* (3).

Sur 26 souris blanches inoculées, dans le péritoine, avec la pulpe de rate, de foie ou de moelle osseuse de chiens ou de souris infectés de kala-azar, j'ai constaté : 4 fois des infections généralisées fortes, 4 fois des infections généralisées moyennes, 13 fois des infections généralisées légères. 5 souris, qui avaient montré des *Leishmania* en plus ou moins grand nombre dans l'exsudat péritonéal, à la suite de l'inoculation, n'ont pas eu d'infection généralisée ou bien elles étaient complètement guéries quand elles ont été sacrifiées.

Deux souris, sacrifiées 24 et 31 jours après l'inoculation, avaient des infections généralisées fortes; une troisième, sacrifiée au bout de 138 jours, avait aussi une infection généralisée forte, mais cette longue durée des infections paraît exceptionnelle. Chez les souris sacrifiées 127 à 203 jours après l'inoculation, j'ai trouvé, presque toujours, des infections légères ou très légères en voie de régression.

Une seule souris a succombé après avoir été inoculée trois fois (deux fois avec des cultures de *Leishmania*, une fois avec la rate broyée d'une souris fortement infectée de kala-azar). Les parasites étaient nombreux dans la rate hypertrophiée et il n'y

(1) A. Laveran et A. Pettit, *Soc. de Biologie*, 15 juin 1909.

(2) A. Laveran, *Acad. des Sciences*, 26 février 1912; *Soc. de path. exotique*, 13 novembre 1912.

(3) W.-L. Yakimoff et N. Kohl-Yakimoff, *Soc. de path. exotique*, 1912, t. V, p. 218 et 355.

avait pas de lésions macroscopiques pouvant expliquer la mort, néanmoins il n'est pas démontré que cette souris ait succombé à la leishmaniose; des infections plus fortes ont été observées chez des souris qui avaient résisté.

Les infections généralisées les plus belles ont été obtenues par l'injection, dans le péritoine, de la pulpe de rate, de foie ou de moelle osseuse, de chiens ou de souris infectés de kala-azar; huit jours après l'inoculation, la ponction péritonéale permet de constater l'existence de *Leishmania* en plus ou moins grand nombre dans l'exsudat; les parasites sont contenus dans des leucocytes (mononucléaires en général) ou dans des cellules endothéliales qui parfois en sont littéralement bourrées, on trouve aussi un certain nombre de *Leishmania* libres. Tantôt l'infection reste ainsi localisée au péritoine, tantôt elle se généralise; les *Leishmania* envahissent la rate, le foie et la moelle osseuse.

L'injection des cultures de *Leishmania infantum* dans le péritoine des souris ne donne, en général, que des résultats négatifs; les flagellés deviennent rapidement la proie des phagocytes qui les détruisent, tandis que les *Leishmania* telles qu'on les rencontre dans les tissus, à l'état préflagellé, peuvent vivre et se multiplier dans les éléments anatomiques qui les ont englobés.

En injectant, dans le foie d'une souris, une culture de *L. infantum*, Laveran a obtenu une infection légère; des infections peuvent aussi être produites, comme M. et Mme Yakimoff l'ont annoncé (1), par l'injection des cultures dans les veines caudales des souris. En se servant d'aiguilles de platine très fines, il est assez facile de réussir cette petite opération; on plonge la queue de la souris dans de l'eau chauffée à 40 degrés environ afin de dilater les veines; le liquide de culture est étendu à moitié avec de l'eau physiologique. On ne réussit, en général, à produire par ce procédé que des infections légères.

La virulence de la *Leishmania infantum* pour les souris, loin d'augmenter à la suite des passages chez ces animaux, comme on pouvait l'espérer, va en décroissant.

(1) W.-L. Yakimoff et Nina K. Yakimoff, *Bullet. Soc. de path. exotique*, 1912, t. V, p. 219.

L'hypertrophie de la rate est une lésion constante chez les souris qui ont des infections généralisées, et c'est dans la rate que l'on rencontre les *Leishmania* le plus souvent et en plus grand nombre.

Sur 24 souris, la rate a été notée, dans 5 cas, comme très fortement hypertrophiée (5 à 6 fois le volume normal); dans 10 cas, comme fortement hypertrophiée (1 fois 1/2 à 2 fois 1/2 le volume normal). Chez une souris, le poids de la rate atteignait 45 centigrammes; chez plusieurs, il était de 25 à 30 centigrammes (1).

Sur 20 souris, chez lesquelles j'ai recherché l'existence des *Leishmania* dans la rate, dans le foie et dans la moelle osseuse, les parasites ont été trouvés 19 fois dans la rate, 10 fois dans le foie, 5 fois dans la moelle osseuse.

Le fait que la rate, chez les différentes espèces animales sensibles, comme chez l'homme, est un lieu d'élection pour les *Leishmania*, montre, une fois de plus, que ce viscère joue fort mal le rôle de défense qui lui a été attribué par quelques observateurs.

Je résume ci-dessous les observations de quelques-unes des souris qui, inoculées par moi avec la *L. infantum*, ont eu des infections généralisées (2).

Souris 1. — Inoculée le 25 janvier 1912, dans le péritoine, avec la rate et la moelle osseuse d'un chien fortement infecté par la *L. infantum*. — L'examen de l'exsudat péritonéal fait le 5 février révèle l'existence de *Leishmania* nombreuses, beaucoup plus nombreuses que dans l'émulsion qui a été inoculée le 25 janvier. Les parasites sont inclus dans des leucocytes mononucléaires ou dans de grandes cellules endothéliales.

De nouveaux examens de l'exsudat péritonéal faits les 12 et 24 février révèlent encore l'existence des *Leishmania*, mais en moins grand nombre que lors du premier examen.

La souris est sacrifiée le 25 février; on ne trouve plus, dans le péritoine, qu'un exsudat blanchâtre très peu abondant. La rate, fortement hypertrophiée, a cinq à six fois le volume normal. Le foie ne présente pas d'altération macroscopique.

Des frottis sont faits avec la rate, le foie et la moelle osseuse; après dessiccation et fixation par l'alcool-éther, ils sont colorés au moyen de la solution de Giemsa. On trouve, dans tous les frottis de la rate, du foie et

(1) Le poids normal de la rate d'une souris de 20 gr. est de 7 à 8 centigrammes.

(2) A. Laveran, *Acad. des Sciences*, 26 février 1912 et *Soc. de path. exotique*, 13 novembre 1912.

de la moelle osseuse, des *Leishmania* en grand nombre qui souvent sont libres, probablement à la suite de la destruction des éléments anatomiques dans lesquels les parasites s'étaient développés.

Souris 2. — Inoculée le 25 janvier 1912, dans le péritoine, avec la pulpe de rate et de moelle osseuse d'un chien infecté de kala-azar. Des examens de l'exsudat péritonéal faits les 1er, 8 et 17 février révèlent l'existence de *Leishmania* qui, nombreuses lors du premier examen, sont plus rares lors des examens suivants. L'exsudat ensemencé le 1er février dans deux tubes du milieu de Novy simplifié donne de belles cultures de *Leishmania*.

La souris est sacrifiée le 11 juin 1912, 138 jours après l'inoculation. Pas d'exsudat péritonéal. La rate est fortement hypertrophiée, elle a cinq à six fois le volume normal. On trouve des *Leishmania* nombreuses dans les frottis de rate, rares dans les frottis de foie; l'examen d'un frottis de moelle osseuse est négatif.

Souris 3. — Inoculée le 25 janvier 1912, comme la souris 1. Des examens de l'exsudat péritonéal, faits les 3, 10 et 24 février, révèlent l'existence de *Leishmania* qui, nombreuses le 3 février, deviennent plus rares aux examens suivants. L'exsuda ensemencé le 3 février sur milieu de Novy simplifié donne une belle culture.

La souris est sacrifiée le 7 mars 1912, 42 jours après l'inoculation. Pas d'exsudat péritonéal. La rate a cinq à six fois le volume normal. *Leishmania* assez nombreuses dans les frottis de rate, rares dans les frottis de moelle osseuse; l'examen des frottis de foie est négatif.

Souris 4. — Inoculée le 25 février 1912, dans le péritoine, avec la rate et le foie broyés de la souris 1. L'examen de l'exsudat péritonéal, fait le 6 mars, montre des *Leishmania* en très grand nombre.

La souris est sacrifiée le 20 mars, 24 jours après l'inoculation. Exsudat péritonéal très rare, contenant encore des *Leishmania* nombreuses. Rate fortement hypertrophiée. *Leishmania* nombreuses dans les frottis de la rate et du foie. Les parasites sont endocellulaires ou libres; un certain nombre de *Leishmania* se trouvent dans des cellules hépatiques. La moelle osseuse est moins parasitée que la rate et le foie.

Souris 5. — Inoculée le 25 février 1912, comme la souris 4. 6 mars, *Leishmania* nombreuses dans l'exsudat péritonéal.

La souris est sacrifiée le 27 mars, 31 jours après l'inoculation. Exsudat péritonéal presque nul, avec *Leishmania* très rares. Rate hypertrophiée. Les parasites, assez nombreux dans les frottis de rate, sont assez rares dans les frottis de foie, et très rares dans les frottis de moelle osseuse.

Souris 6. — Inoculée le 25 février 1912, comme les souris 4 et 5. 8 mars, *Leishmania* très nombreuses dans l'exsudat péritonéal, principalement dans les cellules endothéliales.

La souris est sacrifiée le 4 avril 1912, 39 jours après l'inoculation. Pas d'exsudat péritonéal. Rate hypertrophiée. La souris pèse 20 grammes; la rate pèse 25 centigrammes. *Leishmania* assez nombreuses dans les frottis de rate et de foie, très rares dans les frottis de moelle osseuse.

Souris 7. — Inoculée le 25 février 1912, comme les souris 4, 5 et 6. 8 mars, *Leishmania* assez nombreuses dans l'exsudat péritonéal, principalement dans les grandes cellules endothéliales.

La souris est sacrifiée le 21 août 1912, 178 jours après l'inoculation. La rate est très fortement hypertrophiée : la souris pèse 21 grammes; la rate pèse 45 centigrammes. *Leishmania* assez nombreuses dans les frottis de rate; l'examen des frottis de foie et de moelle osseuse est négatif.

Rats. — Les rats inoculés dans le péritoine avec la pulpe de la rate, du foie ou de la moelle osseuse d'animaux atteints de leishmaniose, peuvent présenter des infections généralisées. Un rat, inoculé par moi avec la pulpe de la rate et du foie d'une souris infectée, et mort, 12 jours après l'inoculation, avec de la diarrhée, avait des *Leishmania* assez nombreuses dans l'exsudat péritonéal, très rares dans la rate qui était hypertrophiée (1).

Chez un rat, inoculé par M. et Mme Yakimoff, les *Leishmania* n'ont pas été vues sur les frottis de rate, mais l'ensemencement d'un morceau de la rate a donné une culture (2).

Les rats s'infectent beaucoup plus difficilement que les souris.

C. Nicolle a inoculé sans succès 4 rats blancs avec la pulpe d'organes infectés par la *L. infantum* (3).

Visentini a inoculé sans succès avec des cultures de la *L. infantum* 10 rats blancs dans le péritoine, sous la peau ou dans les veines. Les flagellés injectés dans le péritoine deviennent rapidement la proie des leucocytes (4).

Cobaye. — En 1909, Laveran et Pettit ont montré qu'on pouvait provoquer chez les cobayes des infections légères en leur inoculant, dans le péritoine, le produit du raclage ou du broyage d'organes provenant d'animaux infectés de kala-azar (5). 59 jours après l'inoculation, on trouvait encore dans la cavité péritonéale d'un cobaye des *Leishmania* typiques, susceptibles de donner des éléments flagellés dans le milieu de Novy simplifié.

Franchini a obtenu une infection générale chez un jeune cobaye après injection, dans le péritoine, de 1 cent. cube de culture de *Leishmania* de 8e passage et du 15e jour environ. L'animal,

(1) A. Laveran, *Bullet. Soc. de path. exotique*, 13 novembre 1912, t. V, p. 719.
(2) W.-L. Yakimoff et Nina K. Yakimoff, *Bullet. Soc. de path. exotique*, 12 juin 1912, t. V, p. 357.
(3) C. Nicolle, *Ann. Inst. Pasteur*, 1909, t. XXIII, p. 441.
(4) A. Visentini, *Soc. de path. exotique*, 12 juin 1912.
(5) A. Laveran et A. Pettit, *Soc. de Biologie*, 3 juillet 1909.

qui avait beaucoup maigri, fut sacrifié 26 jours après l'inoculation et, dans les frottis de la rate, du foie, de la moelle osseuse et du sang, on trouva des *Leishmania* typiques, plus nombreuses dans les frottis de la rate que dans les autres (1).

Mais, à côté de ces faits positifs, on peut citer des faits négatifs en plus grand nombre.

C. Nicolle a inoculé sans succès 4 cobayes avec de la pulpe d'organes riche en *L. infantum* (2).

C. Nicolle et L. Blaizot ont inoculé 4 très jeunes cobayes dans la jugulaire externe avec des cultures de *L. infantum*; les cobayes sacrifiés du 15e au 80e jour après l'inoculation n'ont pas montré de *Leishmania* (3).

J'ai eu des résultats négatifs chez 2 cobayes inoculés dans le foie avec la pulpe d'organes d'un chien infecté de kala-azar, chez un cobaye inoculé, dans le péritoine, avec la sérosité péritonéale d'un cobaye infecté et chez 4 cobayes ayant reçu, dans le foie, dans le péritoine ou sous la peau, de fortes doses de culture de *L. infantum*. Un cobaye inoculé, dans le péritoine, avec la pulpe d'organes d'un chien infecté de kala-azar a eu une infection légère, localisée au péritoine (4).

A. Visentini (*op. cit.*) a inoculé sans succès, avec les cultures de la *L. infantum*, 20 cobayes, par injection du virus dans le péritoine ou sous la peau.

Lapin. — Volpino a réussi à provoquer, chez un lapin, une kératite parenchymateuse en déposant, sur la cornée scarifiée, de la moelle osseuse d'un chien infecté de kala-azar. Au bout de 3 mois, la cornée était opaque, d'un blanc rosé et, sur les frottis, on voyait des *Leishmania* typiques incluses dans de gros mononucléaires (5).

Mantovani a obtenu une infection généralisée chez un lapin auquel il avait injecté, dans la veine marginale d'une des oreilles, 1 cent. cube de culture de *L. infantum*. L'animal, qui avait beaucoup maigri, fut sacrifié 20 jours après l'inoculation

(1) G. Franchini, *Pathologica*, 1er juin 1911 et *München. mediz. Wochenschr.*, 1911, n° 39.
(2) C. Nicolle, *Ann. Inst. Pasteur*, 1909, t. XXIII, p. 441.
(3) C. Nicolle et L. Blaizot, *Soc. de path. exotique*, 13 novembre 1912.
(4) A. Laveran, *Soc. de path. exotique*, 12 février 1913.
(5) G. Volpino, *Pathologica*, 1er février 1911.

et, sur les frottis des organes, on trouva des *Leishmania*; les ensemencements en milieu de culture donnèrent aussi des résultats positifs (1). L'évolution de l'infection dans ce cas a été particulièrement rapide.

C. Nicolle (*op. cit.*) a inoculé sans succès 2 lapins avec de la pulpe d'organes d'animaux infectés de kala-azar.

C. Nicolle et Blaizot (*op. cit.*) ont inoculé à 4 jeunes lapins, dans les veines, des cultures de *L. infantum*; les lapins, sacrifiés du 15e au 80e jour après l'inoculation, étaient indemnes.

Deux jeunes lapins inoculés par moi, dans le péritoine, avec la pulpe d'organes d'un chien infecté de kala-azar ne se sont pas infectés. Il en a été de même de deux jeunes lapins qui ont reçu chacun dans la moelle osseuse, dans le foie ou dans le péritoine, 30 cent. cubes (en 4 fois) de cultures très riches de *L. infantum*, et de 2 lapins qui ont reçu chacun dans les veines marginales des oreilles 5 injections de 1 à 2 cent. cubes de cultures très riches de *L. infantum* (2).

Chat. — Ed. et Et. Sergent, Lombard et Quilichini ont publié, en 1912, une note intitulée : « La leishmaniose à Alger; infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation (3) ». Le chat dont il est question dans ce travail était âgé de 4 mois environ, il fut sacrifié et on trouva dans la moelle osseuse du fémur de très rares *Leishmania*.

C'est, je crois, le seul fait de leishmaniose naturelle du chat qui ait été publié.

Nicolle rapporte que, sur 51 chats provenant de la fourrière de Tunis ou capturés à Gafsa, aucun ne fut trouvé infecté de *Leishmania* (4). Le même observateur a inoculé sans succès 4 chats avec la pulpe d'organes d'animaux infectés de kala-azar. En 1914, 20 chats de Tunis ont été examinés également avec résultat négatif (5).

A plusieurs reprises, j'ai essayé d'inoculer le kala-azar à des chats et les résultats des inoculations ont toujours été négatifs.

Le 6 mai 1909, 3 chats de 8 jours environ sont inoculés avec

(1) M. Mantovani, *Pathologica*, 15 juillet 1912.
(2) A. Laveran, *Soc. de path. exotique*, 12 février 1913.
(3) *Bullet. Soc. de path. exotique*, février 1912, t. IV, p. 93.
(4) C. Nicolle, *Ann. Inst. Pasteur*, juin 1909, t. XXIII, p. 467.
(5) C. Nicolle, *Soc. de path. exotique*, 10 juin 1914.

la pulpe du foie d'un chien infecté de kala-azar; chez un des chats, la pulpe est inoculée sous la peau, chez les 2 autres l'inoculation a lieu dans le péritoine et dans le foie. Les 3 chats restent indemnes; chez le chat inoculé dans le péritoine, on n'observe même pas le développement local des *Leishmania*, qui est commun chez d'autres animaux (souris, rats, cobayes).

Trois jeunes chats inoculés au mois de mai 1912, chacun à trois reprises, dans le foie, avec de fortes doses de cultures de *L. infantum* très riches en flagellés, ne se sont pas infectés. Non seulement, on ne voyait pas de *Leishmania* dans les frottis de rate, de moelle osseuse et de foie, mais les tubes du milieu de Novy simplifié ensemencés avec la moelle osseuse et la rate ou le foie restèrent stériles.

C. Nicolle et L. Blaizot ont inoculé dans la jugulaire externe d'un jeune chat le liquide fourni par 6 tubes de culture de *L. infantum*; le résultat de cette inoculation a été négatif (1).

Au mois d'août 1912, j'ai examiné le contenu de 12 puces capturées sur un des chats inoculés au mois de mai 1912, avec des cultures de *L. infantum*, et chez lesquels je n'ai jamais constaté trace d'infection. Dans le frottis fait avec le contenu d'une des puces appartenant à l'espèce *Ctenocephalus canis*, j'ai trouvé des éléments parasitaires nombreux, ayant la plus grande ressemblance avec des *Leishmania*. Ces éléments, de forme arrondie ou plus souvent ovalaire, mesurent de 2 à 6 μ de long sur 2 à 4 μ de large, ils sont souvent groupés en rosaces. Dans le protoplasme, qui se colore faiblement en bleu par le Giemsa, on distingue un karyosome principal, arrondi ou ovalaire, et un karyosome accessoire souvent allongé en bâtonnet. Je n'ai pas vu de formes munies de flagelles ; néanmoins, il ne me paraît pas douteux que ces parasites doivent être rapportés aux trypanosomides qui ont été décrits chez différentes espèces de puces, notamment par Patton, en 1908, chez *Ctenocephalus felis*, puce qui doit être probablement identifiée à *Ct. canis*, par Porter chez *Pulex irritans* (2) et par Nöller chez 12 p. 100 des *Ct. canis* examinés par lui (3). Si le chat avait été infecté de leishmaniose, on eût été évidemment tenté de supposer que les éléments

(1) C. Nicolle et L. Blaizot, *Soc. de path. exotique*, 13 novembre 1912.
(2) A. Porter, *Parasitology*, octobre 1911.
(3) W. Nöller, *Arch. f. Protistenkunde*, 17 mai 1912.

parasitaires trouvés chez la puce devaient être rapportés à *L. infantum* (1).

Oiseaux. — L'inoculation à une poule, dans la cavité péritonéale, de la pulpe de rate, de foie et de moelle osseuse d'un chien fortement infecté de kala-azar n'a eu aucune suite. Au bout de 5 jours, les *Leishmania* avaient complètement disparu.

Animaux a sang froid. — Lézards. Grenouilles. — Chez un *Lacerta viridis* inoculé dans le péritoine avec la pulpe des organes d'un chien fortement infecté de kala-azar, on voyait encore au bout de 30 jours des *Leishmania* dans les éléments cellulaires obtenus par ponction de l'abdomen, mais les résultats des ensemencements dans le milieu de Novy simplifié étaient négatifs. Chez deux autres *L. viridis*, les *Leishmania* ont disparu rapidement de la cavité péritonéale.

Chez des grenouilles (*R. temporaria* et *R. esculenta*), inoculées dans les mêmes conditions que le lézard, on ne trouvait plus trace des *Leishmania* au bout de 4 jours.

En résumé, la *L. infantum*, agent du kala-azar méditerranéen, est assez facilement inoculable au chien, aux macaques et à la souris, plus difficilement au rat, exceptionnellement au cobaye et au lapin; tous les essais d'inoculation au chat et à d'autres animaux ont échoué.

L'infection expérimentale du chien par la *Leishmania infantum* a la plus grande ressemblance, au point de vue des symptômes et de l'anatomie pathologique, avec la leishmaniose canine naturelle.

C'est le chien qui se prête le mieux aux inoculations en série de *L. infantum*; encore ces inoculations, bien que faites avec de fortes doses de virus, échouent-elles assez souvent ou bien donnent-elles lieu à des infections légères, latentes, difficiles à déceler; à la suite d'un certain nombre de passages par chiens, le virus, loin d'acquérir une activité plus grande pour ces animaux, s'affaiblit.

Nous aurons à comparer, dans une autre partie de ce travail, les infections produites par *L. Donovani* à celles produites par *L. infantum* que nous venons d'étudier. (*A suivre.*)

(1) A. Laveran, *Soc. de path. exotique*, 12 février 1913.

RECHERCHES SUR LE PROTEUS VULGARIS

par Albert BERTHELOT.

(Laboratoire de M. Metchnikoff.)

IV. — Recherches sur les propriétés pathogènes d'une race de Proteus provenant d'un cas de diarrhée infantile.

L'exposé détaillé de ces recherches ayant été déjà publié dans un mémoire d'ensemble (1), je me contenterai de rapporter sommairement les résultats de mes expériences. Celles-ci ont porté sur un *Proteus vulgaris* isolé, par M. Metchnikoff, dans les matières fécales d'un nourrisson de 7 mois, atteint d'une gastro-entérite aiguë. Je la désignerai par les lettres (*Tx*) pour les distinguer de deux autres échantillons que j'ai employés incidemment pour quelques essais comparatifs.

A. — Virulence ; toxicité des cultures, des filtrats, des corps microbiens et des autolysats ; endotoxine et poison de Vaughan.

1° Virulence du Proteus Tx

Pour déterminer la virulence, j'ai utilisé des cultures en bouillon Martin, c'est-à-dire dans un mélange à parties égales de peptone Martin et de bouillon de viande non peptoné. Voici les résultats que j'ai obtenus :

a) *Cultures de* 18 *heures à* 37 *degrés.*

1° *Cobaye* (animaux d'un poids moyen de 500 grammes).

Inoculation sous-cutanée : une dose de 2 cent. cubes déterminait localement une assez forte réaction inflammatoire dont il ne persistait, après 15 jours, d'autre trace qu'un petit nodule induré.

Inoculation intrapéritonéale : avec 1 cent. cube on détermi-

(1) Albert Berthelot, *Thèse de Médecine*, *loc. cit.*, page 35.

nait la mort en 5 à 7 jours : avec 2 cent. cubes les animaux succombaient en 48 heures.

Inoculation intraveineuse (dans la jugulaire) : une dose de 1 cent. cube provoquait la mort en 48 heures environ; avec 1/2 cent. cube, les animaux ne succombaient guère qu'au bout de 3 jours ;

2° *Lapin* (animaux d'un poids moyen de 2.000 grammes).

Inoculation sous-cutanée : avec 5 cent. cubes : abcès, suppuration, cachexie et mort de l'animal à la fin de la troisième semaine ; avec 2 cent. cubes, tuméfaction qui diminuait lentement pour ne laisser, vers le quinzième jour, qu'un gros noyau induré.

Inoculation intrapéritonéale : avec 2 cent. cubes, mort en 8 jours ; avec 3 cent. cubes, mort en 5 jours. Au cours des deux dernières journées les animaux présentaient une très forte diarrhée.

Inoculation intraveineuse : 2 cent. cubes déterminaient la mort en 36 heures environ ; avec 1 cent. cube les animaux succombaient également, mais seulement vers le quatrième jour.

a') *Cultures de 7 jours à 37 degrés.*

1° *Cobaye.*

Inoculation sous-cutanée : Mort vers le sixième jour avec une dose de 2 cent. cubes.

Inoculation intrapéritonéale : Mort en 3 à 4 jours avec 1/2 cent. cube.

Inoculation intraveineuse : Mort en 18-24 heures avec 1/2 cent. cube.

2° *Lapin.*

Inoculation sous-cutanée : Avec 5 cent. cubes, mort en 5 jours ; avec 2 cent. cubes : abcès, suppuration et mort du 11e au 13e jour.

Inoculation intrapéritonéale : Avec 2 cent. cubes mort en 4 jours environ.

Inoculation intraveineuse : Une dose de 1 cent. cube suffisait pour déterminer la mort en moins de 48 heures.

Les cultures de 7 jours en bouillon Martin se sont donc montrées notablement plus virulentes que les cultures de 48 heures.

b) *Emulsion de corps microbiens vivants.*

J'ai également étudié la virulence du *Proteus Tx* inoculé sous forme d'émulsion de jeunes microbiens. J'ensemençais ce microbe sur gélose ordinaire inclinée, exempte d'eau de condensation, et au bout de 24 heures de séjour à 37 degrés, je délayais la culture obtenue dans 10 cent. cubes d'eau physiologique. Cette dilution correspondait sensiblement à une teneur de 2 milligrammes de microbes secs — soit environ 10 milligrammes de corps microbiens frais — par centimètre cube.

J'ai éprouvé cette émulsion par *inoculation intrapéritonéale* et j'ai constaté ce qui suit :

1° *Cobaye* (poids moyen : 500 grammes).

Un 1/2 cent. cube, soit approximativement 5 milligrammes de microbes pesés humides, constituait la dose suffisante pour provoquer la mort en 24 à 36 heures à la suite d'une violente péritonite ;

2° *Lapin* (poids moyen : 2.000 grammes).

Avec le lapin, la dose nécessaire pour déterminer la mort des animaux en 24 *à* 36 *heures* s'élevait à 2 cent. cubes d'émulsion, soit environ 20 milligrammes de microbes frais.

Comme chez le cobaye il y avait une péritonite très violente ; à l'autopsie, on trouvait en abondance le *Proteus* dans le sang du cœur, même lorsque l'ensemencement était pratiqué moins d'une heure après la mort ;

2° Toxicité des cultures totales de Proteus Tx en divers milieux

Pour déterminer cette toxicité, je ne me suis servi que de cultures de 7 jours, stérilisées par l'éther et bien débarrassées de cet anesthésique.

Dans presque toutes les expériences que je vais rapporter, j'ai injecté à des cobayes, dans le péritoine ou dans les veines, des doses croissantes des diverses cultures ; *pour simplifier, je n'indiquerai ici que les doses qu'il m'a fallu atteindre pour provoquer, dans un temps inférieur à* 24 *heures, la mort d'animaux d'un poids moyen de* 500 *grammes.*

a) *Cultures totales en bouillon Martin, stérilisées par l'éther.*

Toxicité pour le cobaye (poids moyen : 500 grammes).

Voie intrapéritonéale. — Dose mortelle 5 cent. cubes ; mort en moins de 18 heures.

Voie intraveineuse. — Dose mortelle 2 c. c. 5 ; mort en moins de 18 heures.

b) *Cultures obtenues avec une solution des produits abiurétiques d'hydrolyse acide de la caséine, stérilisée par l'éther.*

Le milieu employé pour cette expérience était une solution aqueuse à 15 p. 1.000 d'un mélange des acides aminés qui constituent la molécule de caséine.

Dans cette solution exactement neutralisée par la soude, le *Proteus* se développait rapidement et donnait des cultures très abondantes et dont la toxicité était identique à celle des cultures en bouillon Martin.

c) *Cultures en solution de peptone de caséine, stérilisées par l'éther.*

Je me suis servi d'une solution à 20 p. 1.000 d'une peptone pancréatique de caséine que M. Macquaire avait eu l'obligeance de me préparer pour mes recherches sur la fonction indologène.

Les cultures obtenues avec ce milieu étaient moins riches que celles en bouillon Martin, mais plus abondantes que celles de l'expérience précédente.

Toxicité pour le cobaye (poids moyen 500 grammes.)

Voie intrapéritonéale. — Dose mortelle 3 cent. cubes ; mor- en moins de 18 heures.

Voie intraveineuse. — Dose mortelle 2 c. c. 5 ; mort en 16 heures.

d) *Cultures dans une solution d'un mélange commercial d'acides aminés de la viande, stérilisées par l'éther.*

Je me suis servi d'une solution à 20 p. 1.000 d'un produit commercial préparé d'après les indications d'Abderhalden.

Cette solution constitue un excellent milieu de culture pour un grand nombre de microbes ; le *Proteus* s'y développe très vite et très abondamment.

Toxicité pour le cobaye (poids moyen de 500 grammes).

Voie intrapéritonéale. — Dose mortelle 3 cent. cubes ; mort en 18 heures.

Voie intraveineuse. — Dose mortelle 4 cent. cubes ; mort en 6 heures.

c) *Cultures dans un milieu chimiquement défini, stérilisées par l'éther.*

Le milieu que j'ai employé avait la composition suivante :

Eau	500,00
Phosphate dipotassique	1,00
Sulfate de magnésium	0,50
Glycocolle	0,75
Aspartate de sodium	0,50
Chlorhydrate de l'acide glutamique	0,50
Alanine	0,50
Chlorhydrate d'histidine	0,50
Tyrosine	0,25
Tryptophane	0,25
Leucine	0,30
Phénylalanine	0,30
Chlorhydrate de guanidine	0,20
Créatine	0,20
Chlorhydrate de glucosamine	0,20
Cystine	0,10

Dans le milieu ainsi préparé le *Proteus* ne donnait pas d'aussi belles cultures qu'en bouillon Martin ou que dans le milieu précédent ; mais elles étaient aussi riches que celles obtenues avec les acides aminés de la caséine.

Toxicité pour le cobaye (poids moyen 500 gr.) (*Proteus Tx*). Cette toxicité est pratiquement nulle, puisqu'il faut dépasser 10 cent. cubes dans le péritoine et 5 cent. cubes dans les veines.

En présence de ces résultats, j'ai cultivé sur ce même milieu et sur la solution d'acides aminés de la viande un *Proteus* isolé d'une putréfaction (*Proteus PV*) sensiblement moins virulent que le *Proteus Tx* et j'ai constaté ce qui suit :

Toxicité pour le cobaye (poids moyen : 500 gr.) (*Proteus PV*).

Milieu D. — *Voie intrapéritonéale.* Dose mortelle 5 cent. cubes ; mort en moins de 18 heures.

Voie intraveineuse. — Dose mortelle 2 c. c. 5 ; mort en 18 heures.

Milieu E. — *Voie intrapéritonéale.* Dose mortelle 1 cent. cube ; mort en moins de 18 heures.

Voie intraveineuse. — Dose mortelle 4 cent. cubes ; mort en 20 heures.

L'absence de toxicité des cultures du *Proteus Tx* dans le milieu E ne dépendait donc qu'indirectement de la composition de celui-ci.

3° Toxicité des filtrats (bougie Chamberland, n° 3).

a) *Filtrat culture en bouillon Martin.*

Toxicité pour le cobaye (poids moyen : 500 grammes).

Voie intrapéritonéale. — Dose mortelle : supérieure à 12 cent. cubes.

Voie intraveineuse. — Dose mortelle : supérieure à 5 cent. cubes.

b) *Filtrat culture acides aminés de la caséine (hydrolyse acide).*

Toxicité pour le cobaye (poids moyen : 500 grammes).

Voie intrapéritonéale. — Dose mortelle : supérieure à 12 cent. cubes.

Voie intraveineuse (non étudiée).

c) *Filtrat culture peptone de caséine.*

Toxicité pour le cobaye (poids moyen : 500 grammes).

Voie intrapéritonéale. — Dose mortelle 8 cent. cubes ; mort en moins de 18 heures.

Voie intraveineuse. — Dose mortelle 2 c. c. 5 ; mort entre 18 et 24 heures.

d) *Filtrat culture acides aminés de la viande (Hydrolyse diastasique).*

Toxicité pour le cobaye (poids moyen : 500 grammes).

Voie intrapéritonéale. — Dose mortelle : supérieure à 12 cent. cubes.

Voie intraveineuse. — Dose mortelle 4 cent. cubes ; mort en 20 heures.

e) *Filtrat culture milieu chimiquement défini.*

Toxicité pour le cobaye (poids moyen : 500 grammes).

Voie intrapéritonéale. — Dose mortelle : supérieure à 10 cent. cubes.

Voie intraveineuse. — Dose mortelle : supérieure à 5 cent. cubes.

Au point de vue de la formation de produits toxiques solubles, c'est donc la peptone pancréatique de caséine qui m'a donné les meilleurs résultats (1).

(1) Des cobayes témoins ne présentaient aucun signe d'intoxication lorsqu'on leur injectait dans la veine 5 cent. cubes de la solution stérile de peptone de caséine.

Tito Carbone ayant montré que dans les cultures de *Proteus* on trouve des bases comme la choline, l'éthylènediamine, le gadinine et la triméthylamine, j'ai essayé de déterminer la part qui revient à ces substances dans les cultures totales du *Proteus Tx*.

Dans ce but j'ai pris une culture de 7 jours en bouillon Martin, stérilisée par l'éther et dont la dose mortelle par voie intrapéritonéale était de 5 cent. cubes pour un cobaye d'environ 500 grammes; je l'ai additionnée de 10 volumes d'alcool à 96 degrés, et j'ai laissé reposer le mélange pendant 24 heures.

Je l'ai alors filtré sur papier pour séparer le précipité formé et j'ai distillé dans le vide à 50 degrés le liquide clair obtenu. J'ai repris le résidu de cette distillation par de l'eau physiologique (1) en quantité telle que le volume de la solution ainsi obtenue soit le dixième de celui de la culture employée.

Les poisons de nature albuminoïdique ayant été précipités par l'alcool, cette solution ne renfermait guère comme substances très nocives que les substances alcaloïdiques; elle donnait d'ailleurs un précipité avec les acides phosphotungstique ou silicotungstique et avec une solution iodo-iodurée. Je l'ai éprouvée sur le cobaye par voie intrapéritonéale et j'ai trouvé que la dose mortelle était de 4 cent. cubes. Cette dose représentant 40 cent. cubes de la culture primitive, on voit donc que les ptomaïnes ne constituaient qu'une très faible part des produits toxiques élaborés dans les cultures par le *Proteus Tx*.

4° Toxicité des corps microbiens

Pour toutes les expériences qui vont suivre j'ai utilisé des corps microbiens obtenus par la méthode de M. Maurice Nicolle, en employant les grandes cuvettes métalliques dont il a établi le modèle, en collaboration avec M. Alilaire (1).

(1) M. Nicolle, Etudes sur la morve expérimentale du cobaye. *Ann. Inst. Pasteur*, août 1906, p. 626.

M. Nicolle et Alilaire, Note sur la production en grand des corps bactériens et sur leur composition chimique. *Ann. Inst. Pasteur*, juillet 1909, p. 547.

Toutefois, j'ai substitué à la gélose, viande, pomme de terre, préconisée par M. Nicolle, un milieu plus économique dont le procédé de préparation est basé sur la méthode générale que j'ai publiée il y a trois ans (1).

Voici d'ailleurs la technique que j'ai adoptée :

Deux kilogrammes de viande de cheval hachée, bien maigre, étaient placés dans une marmite émaillée et mis en suspension dans la solution suivante :

Eau bouillante	5 litres.
Lessive de soude chimiquement pure à 36 Baumé . .	135 cent. cubes.

Le tout était porté à l'autoclave et maintenu à 134 degrés pendant une heure et demie. Aussitôt le mélange sorti de l'autoclave, je l'acidifiais *très légèrement* avec de l'acide chlorhydrique chimiquement pur, puis je l'abandonnais jusqu'au lendemain. Je le passais alors sur un tamis de crin, de façon à séparer les débris de tendons et d'aponévroses ainsi que de petites masses d'acides gras; j'avais ainsi une solution renfermant tous les protéiques de la viande à l'état de deutéroprotéoses, c'est-à-dire au stade de désintégration de la molécule albuminoïde le plus rapproché des peptones de Kühne.

J'ajoutais à ces cinq litres de solution le même volume d'une bouillie très fluide, passée au tamis, obtenue en délayant dans cinq litres d'eau 2 kilogrammes de pommes de terre pelées, découpées en petits fragments et cuites 30 minutes à l'autoclave à 120 degrés.

Je neutralisais ce mélange, qui contenait alors une proportion de chlorure de sodium voisine de la teneur habituelle des milieux de culture, puis j'y introduisais 300 grammes de gélose. Je portais le tout à 120 degrés pendant une heure et enfin je répartissais le milieu dans des fioles à fond plat d'un litre que je stérilisais à 120 degrés. Dans chaque fiole je mettais environ 650 cent. cubes, c'est-à-dire le volume convenable pour une cuvette.

Le dépôt abondant que contenait ce milieu imposait naturellement la précaution de le couler très chaud dans les boîtes, en agitant le mieux possible les fioles qui le renfermaient; mais, après refroidissement, sa surface était aussi solide et aussi unie que celle du milieu de M. Nicolle. De même que cette gélose, il m'a constamment donné, par cuvette, un rendement moyen de 5 grammes de corps microbiens humides; la toxicité de ceux-ci était la même avec les deux milieux.

Ces résultats concernant le *Proteus*, c'est-à-dire un microbe très facile à cultiver et possédant même, d'après les travaux de certains auteurs, une affinité marquée pour les protéoses, il serait prudent de faire un essai en petit avant d'utiliser ce milieu pour la culture en grand d'une autre bactérie.

Dans toutes mes expériences j'ai récolté les corps microbiens après 18 à 20 heures de culture à 37 degrés; j'y ai plusieurs fois dosé l'humidité et j'ai toujours trouvé, à quelques décigrammes

(1) Albert Berthelot, Préparations des milieux de culture par l'hydrolyse alcaline ménagée des substances albuminoïdes naturelles. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXVIII, 30 avril 1910, p. 757.

près, une teneur en eau de 80 p. 100, très voisine par conséquent du chiffre donné par MM. Nicolle et Alilaire pour le *Proteus vulgaris*.

Les essais suivants ont tous été exécutés avec des corps microbiens desséchés, représentant par conséquent cinq fois leur poids de bacilles frais, mais j'exprimerai tous les résultats en milligrammes de microbes humides.

1° *Toxicité des corps microbiens desséchés à 37 degrés (Proteus Tx).*

Cobaye (poids moyen : 500 grammes).

Voie intrapéritonéale. — Dose mortelle : 100 milligrammes de corps bacillaires humides. Mort en moins de 18 heures ; exsudat péritonéal stérile.

Voie intraveineuse. — Dose mortelle : 50 milligrammes ; mort en 20 heures.

2° *Toxicité des corps microbiens légèrement autolysés et desséchés dans le vide.*

Cobaye (poids moyen : 500 grammes).

Voie intrapéritonéale. — Dose mortelle : 300 milligrammes bacilles humides ; mort en 18 heures.

Voie intraveiceuse. — Dose mortelle : 50 milligrammes ; mort en 15 heures.

3° *Toxicité des corps microbiens plasmolysés par le chlorure de calcium et débarrassés de ce sel par le dialyse.*

Cobaye (poids moyen : 500 grammes).

Voie intrapéritonéale. — Dose mortelle : 50 milligrammes bacilles humides ; mort en moins de 18 heures.

Voie intraveineuse. — Dose mortelle : 50 milligrammes ; mort en 19 heures.

4° *Toxicité des corps microbiens tués par l'acétone.*

Cobayes (poids moyen : 500 grammes).

Voie intrapéritonéale. — Dose mortelle : 100 milligrammes bacilles humides ; mort en 24 heures.

Voie intraveineuse. — Dose mortelle : 10 milligrammes ; mort en 20 heures.

5° *Toxicité des corps microbiens tués par l'alcool.*

Cobaye (poids moyen : 500 grammes).

Voie intrapéritonéale. — Dose mortelle : 150 milligrammes bacilles humides ; mort en moins de 18 heures.

Voie intraveineuse. — Dose mortelle : 25 milligrammes; mort en 20 heures.

6° *Toxicité des corps microbiens épuisés par une solution de carbonate de sodium à 5 p. 100.*

Cobaye (poids moyen : 500 grammes).

Voie intrapéritonéale. — Dose mortelle : 25 milligrammes bacilles humides; mort en moins de 18 heures.

Voie intraveineuse. — Dose mortelle : 25 milligrammes; mort en 15 heures.

7° *Toxicité des corps microbiens épuisés par l'alcool, l'acétone, l'éther et le chloroforme.*

Cobaye (poids moyen : 500 grammes).

Voie intrapéritonéale. — Dose mortelle : 150 milligrammes de bacilles humides; mort en 18 à 24 heures.

Voie intraveineuse. — Dose mortelle : 10 milligrammes; mort en 20 heures.

Comme on le voit par ces diverses expériences, les corps microbiens du *Proteus* que j'ai étudié possèdent une toxicité propre assez élevée, particulièrement lorsqu'ils ont été traités par l'alcool, l'acétone ou une solution faiblement alcaline.

5° Toxicité des autolysats.

a) *Autolysat de 2 grammes de bacilles humides abandonnés pendant 1 mois dans 20 cent. cubes d'eau physiologique, traité par l'éther comme les cultures totales* :

Cobaye (poids moyen : 500 grammes).

Voie intrapéritonéale et voie intraveineuse. — Dose mortelle : 1/4 de cent. cube correspondant à 25 milligrammes de bacilles humides ; mort en moins de 18 heures.

Lapin.

Voie intrapéritonéale. — 300 milligrammes de bacilles humides, soit 3 cent. cubes d'autolysat, étaient nécessaires pour tuer en moins de 18 heures un lapin de 2 kilogrammes.

Voie intraveineuse. — Il suffisait de 100 milligrammes de bacilles, soit 1 cent. cube d'autolysat pour déterminer la mort d'un lapin de 2.480 grammes en 8 heures.

Après avoir ainsi déterminé la toxicité de l'autolysat total, j'ai centrifugé ce qui m'en restait et j'ai éprouvé chez le cobaye et le lapin le liquide clair obtenu :

Cobaye (poids moyen : 500 grammes).

Voie intrapéritonéale. — Les doses correspondant à 25 et 50 milligrammes de bacilles frais étaient sans effet apparent.

Voie intraveineuse. — Dose mortelle : V gouttes de liquide correspondant environ à 25 milligrammes de bacilles humides; mort de l'animal en 15 heures.

Lapin. — Par voie intraveineuse une dose de liquide correspondant à 100 milligrammes a suffi pour tuer en 18 heures un animal de 2.515 grammes.

La toxicité de l'autolysat centrifugé était donc, pour la voie intraveineuse, à peu près identique à celle de l'autolysat total.

b) *Autolysat de bacilles frais mis en suspension dans* 3 *fois leur poids d'eau physiologique et abandonnés pendant* 6 *mois à l'abri de la lumière et à la température du laboratoire.*

Cobaye (poids moyen : 500 grammes).

Voie intrapéritonéale. — La dose mortelle correspondait à 125 milligrammes de bacilles humides ; la mort survenait en moins de 18 heures.

Voie intraveineuse. — La dose mortelle équivalait à 60 milligrammes de bacilles ; mort en 19 heures.

Cet autolysat, vieux de 6 mois et obtenu en présence d'éther, était donc notablement moins toxique que le précédent, qui d'ailleurs était déjà beaucoup moins actif pour une même dose de bacilles, qu'une simple émulsion de corps microbiens modifiés par l'alcool, l'acétone ou un carbonate alcalin. Du reste, l'expérience n° 2 des essais faits avec les corps bactériens montrait déjà un affaiblissement de la toxicité pour une simple autolyse de 48 heures sans addition d'eau.

6° Endotoxine et poison de Vaughan.

Le procédé de Besredka (1), appliqué au *Proteus Tx*, m'a donné une solution peu toxique, aussi ai-je essayé d'obtenir l'endotoxine par une autre méthode. Pour cela j'ai délayé peu à peu, dans un mortier de Joulie, des corps microbiens humides

(1) Besredka, Des endotoxines solubles. *Ann. Inst. Pasteur*, t. XXV, avril 1906, p. 304.

(gélose Nicolle) dans trois fois leur poids de glycérine pure à 30 degrés; j'ai laissé la glycérine agir pendant 1 heure à la température du laboratoire, puis j'ai additionné le mélange de dix volumes d'alcool absolu. J'ai laissé se déposer le précipité de corps microbiens, puis j'ai siphonné la liqueur alcoolique surnageante. J'ai repris les microbes par le même volume d'alcool et répété encore deux fois cette opération, j'ai fait dans les mêmes conditions un lavage à l'alcool-éther et j'ai terminé par un lavage à l'éther à 66 degrés.

J'ai essoré les corps bacillaires sur un entonnoir de Büchner, puis je les ai laissés 24 heures à 37 degrés et 24 heures dans le vide, sur l'acide sulfurique, à la température ordinaire. J'ai déterminé leur toxicité massive qui était exprimée par les chiffres suivants :

Cobaye (poids moyen : 500 grammes).

Voie intrapéritonéale. — Dose mortelle : 150 milligrammes de bacilles humides.

Voie intraveineuse. — Dose mortelle : 50 milligrammes.

Dans les deux cas mort en plus de 6 heures et moins de 18. Pour extraire l'endotoxine j'ai mis en suspension 1 gramme de microbes secs ainsi plasmolysés par la glycérine dans 50 cent. cubes d'eau physiologique et j'ai laissé en contact, à la température du laboratoire, pendant 24 heures; au bout de ce temps, j'ai centrifugé longuement à l'aide d'une centrifugeuse de Jouan pour séparer complètement les corps bacillaires. J'ai obtenu ainsi un liquide parfaitement clair, légèrement jaunâtre que j'ai éprouvé sur de petits cobayes d'un poids moyens de 300 gr.

Par *voie intrapéritonéale*, la dose mortelle était de 4 cent. cubes, volume de solution contenant l'endotoxine de 80 milligrammes de microbes secs, c'est-à-dire 400 milligrammes de bacilles humides.

Par *voie intraveineuse*, la dose mortelle était de 2 cent. cubes contenant l'endotoxine de 200 milligrammes de bacilles humides.

Les animaux injectés dans le péritoine présentaient d'abord au bout de 5 à 6 heures les mêmes symptômes qu'avec la solution obtenue par la méthode de Besredka, mais vers la huitième heure ils tombaient sur le flanc, le train postérieur paralysé et mouraient vers la vingtième heure ; les cobayes injectés dans

les veines présentaient des symptômes analogues, mais la mort survenait beaucoup plus vite, au bout de 9 heures.

J'ai arrêté là mes essais, mais ils sont suffisants pour montrer que l'on peut, par le procédé que je viens d'indiquer, extraire une endotoxine des corps microbiens jeunes du *Proteus vulgaris*; cette substance ne semble d'ailleurs être qu'un facteur de toxicité peu important pour la race que j'ai examinée.

D'autre part, pour extraire le « poison de Vaughan » du *Proteus Tx*, j'ai appliqué à 10 grammes de corps microbiens la technique si bien précisée par S. M. Wheeler (1). J'ai obtenu finalement 1 gr. 35 d'une poudre jaune entièrement soluble dans l'alcool absolu bouillant et dans l'eau. J'en ai fait une solution dans l'eau physiologique, à une concentration telle que 1 cent. cube correspondait à 20 milligrammes; j'ai déterminé la toxicité de cette liqueur en injectant des doses croissantes dans la jugulaire de très gros cobayes d'un poids moyen de *700 grammes*. Il m'a fallu atteindre la dose de 45 milligrammes pour obtenir la mort immédiate des animaux — en 3 à 4 minutes — avec la dyspnée violente si caractéristique.

La toxicité du poison de Vaughan que j'ai extrait du *Proteus Tx* est donc *relativement* faible, puisque la dose mortelle établie par M. Nicolle et G. Abt (2) pour le *B. coli* était seulement de 3 milligrammes.

B. — Essais d'immunisation contre un Proteus provenant d'un cas grave de diarrhée infantile.

M. Cantù ayant annoncé qu'il allait entreprendre des recherches d'ensemble sur la vaccination et la sérothérapie contre le *Proteus*, je me suis borné à rechercher s'il était facile d'immuniser les animaux avec une race isolée d'un cas grave de diarrhée infantile.

L'échantillon que j'ai utilisé pour toutes mes expériences avait été isolé par M. Metchnikoff des matières fécales d'un nourrisson mortellement atteint d'une gastro-entérite aiguë.

(1) Sybil May Wheeler, A study of the chemistry of bacterial cellular proteins. *Journal of Biological Chemistry*, t. VI, 1909, p. 508.

(2) M. Nicolle et Abt, Les anticorps des albuminoïdes et des cellules. *Ann. Inst. Pasteur*, t. XXII, 1908, p. 132.

Sa virulence et sa toxicité étaient assez grandes, ainsi que le montrent les chiffres suivants :

1° Culture de 7 jours en bouillon Martin, *vivante* : 1/2 cent. cube en injection intrapéritonéale tuait en 24 heures un cobaye de 500 grammes (avec une culture de 24 heures il fallait 2 cent. cubes) ;

2° Culture de 7 jours en bouillon Martin, *stérilisée* par l'éther : la mort du cobaye de 500 grammes survenait en 24 à 30 heures à la suite d'une injection de 2 cent. cubes dans le péritoine. L'injection intraveineuse de 1 cent. cube tuait les animaux en moins de 18 heures ;

3° Corps microbiens vivants âgés de 24 heures : 3 milligrammes de bacilles humides injectés dans le péritoine, déterminaient en 24 heures la mort de cobayes d'environ 500 grammes.

Pour tuer en 24 heures des lapins d'environ 2.000 grammes, il suffisait de leur injecter, dans le péritoine, 2 cent. cubes d'une culture en bouillon Martin, vieille de 7 jours, ou 10 milligrammes de corps microbiens jeunes.

Possédant ainsi un microbe assez virulent, j'ai eu tout d'abord la curiosité de répéter les expériences de Foà, Bonome et Tito Carbone (1) sur l'action anti-infectieuse de la choline et de la neurine à l'égard du *Proteus* (2).

J'ai obtenu des résultats confirmant ce qu'avaient avancé ces divers auteurs, c'est-à-dire que l'injection d'une faible dose de choline ou de neurine dans les veines d'un lapin, le protège contre une dose sûrement mortelle de *Proteus* injectée 24 heures après *dans le péritoine*.

Cette constatation m'a conduit à rechercher si l'action protectrice de ces deux bases était limitée au *Proteus*. J'ai fait quelques essais avec le *B. coli*, le Pneumobacille de Friedlander ainsi que le B. pyocyanique et ils m'ont permis d'établir que la choline et la neurine semblent bien susceptibles de renforcer considérablement la résistance de l'organisme à divers virus,

(1) Foa et Bonome, *Archives italiennes de Biologie*, 8 avril 1887, 16 décembre 1889, Académie de Médecine de Turin.

Tito Carbone, Ueber die vom *Proteus vulgaris* erzeugten Gifte. *Centralbl. f. Bakteriologie*, 1890, t. VIII, Originale, p. 768.

(2) Albert Berthelot, *Thèse de Médecine*, *loc. cit.*, p. 64.

tout au moins lorsque ceux-ci sont introduits par la voie intrapéritonéale. Dans quelles conditions et dans quelles limites cette action anti-infectieuse peut-elle se manifester, quel en est le mécanisme et quelles applications thérapeutiques pourra-t-on peut-être en faire? C'est ce que j'essaierai d'établir.

Comme essais d'immunisation, j'ai tenté *simplement* de vacciner des lapins et des cobayes contre l'infection par voie *intrapéritonéale*. Pour immuniser les lapins, j'ai utilisé des bacilles vivants que j'injectais dans les veines, à doses croissantes, après les avoir dilués dans un grand volume d'eau. Voici d'ailleurs le compte rendu d'une expérience :

Proteus M, culture de 24 heures sur gélose ordinaire (tube de 170 millim. × 17 millim.). Totalité de la culture délayée dans l'eau physiologique, centrifugée, lavée trois fois et amenée au volume de 10 cent. cubes.

Deux lapins : 2.680 et 2.450 grammes. A chacun d'eux, injecté *très lentement* dans les veines :

1er jour :	1 goutte	d'émulsion au 1/10e (diluée dans 10 cent. cubes eau physiologique).
6e jour :	2 goutes	
11e jour :	4 gouttes	
16e jour :	6 gouttes	
21e jour :	8 gouttes	
26e jour :	10 gouttes	
31e jour :	15 gouttes	

Le 36e jour, les deux animaux furent éprouvés par injection intrapéritonéale de 2 cent. cubes d'une culture de 7 jours en bouillon Martin; tous les deux résistèrent. Ils étaient encore vivants et bien portants, 15 jours après l'inoculation d'épreuve, alors qu'un témoin de 2.530 grammes était mort en 24 heures.

Ayant ainsi immunisé des lapins par voie intraveineuse, j'ai essayé, en collaboration avec mon collègue et ami, M. D.-M. Bertrand, de vacciner des cobayes par voie sous-cutanée. Nous avons employé le même *Proteus M*; nos vaccins, préparés avec des corps microbiens jeunes, correspondaient tous à la dilution d'une culture de 24 heures sur gélose ordinaire (tube de 170 millim. × 17 millim.) dans 10 cent. cubes d'eau physiologique.

Dans une même expérience nous avons essayé les sept émulsions suivantes :

I. *Bacilles vivants sensibilisés* suivant la technique de Besredka avec le sérum des deux lapins immunisés par les injections intraveineuses. Nous avons vérifié par l'épreuve du péritoine, faite d'après les indications de Dopter (1), que ce sérum très agglutinant était aussi antimicrobien.

II. *Bacilles stérilisés par l'éther* suivant la technique de Vincent.

III. *Bacilles stérilisés par le chlorure d'éthyle* (2).

IV. *Bacilles stérilisés par la chaleur*, une heure à 55°.

V. *Bacilles stérilisés par l'alcool à 50°* ; contact de 24 heures.

VI. *Bacilles traités par le bleu de méthylène* ; contact de 24 heures, solution aqueuse à 1 p. 100, bleu médicinal Hoechst. Bacilles vivants.

VII. *Bacilles traités par l'iode.* Action prolongée 24 heures de la solution : Eau 100; KI 0,2; I 0,1.

Dans toutes ces préparations, les bacilles avaient été lavés deux fois par centrifugation en présence d'eau physiologique.

Nous avons injecté 1 cent. cube de chacun de ces vaccins sous la peau de deux cobayes de 4 à 500 grammes; 7 jours après, nous avons fait une nouvelle injection de 1 c.c. 5; enfin, après un nouveau repos de 7 jours, nous avons encore injecté 2 cent. cubes.

Indépendamment de ces quatorze cobayes, nous en avons traité trois par des injections sous-cutanées de bacilles vivants non modifiés; mais, si la première injection de 1 cent. cube ne leur avait causé qu'un empâtement dur assez volumineux, la seconde, de 1 c.c. 5, a provoqué la formation de lésions suppurées qui nous ont empêché de pratiquer la troisième. D'ailleurs, au bout de 5 semaines, les trois témoins étaient morts, l'un de pneumonie, les deux autres cachectiques.

Voici maintenant ce que nous avons observé avec les divers vaccins : après la première injection, les animaux qui avaient été traités par I, II et III ont présenté pendant 2 ou 3 jours un petit nodule induré ; les autres ont eu une réaction locale un peu plus intense avec une induration plus persistante, sauf un des cobayes traité par IV. Après la seconde injection, la réaction a été la même pour III, IV, V et VII, mais plus accusée pour les autres, particulièrement avec II ; enfin la troisième injection,

de 2 cent. cubes, a causé un léger empâtement, disparu en 3 à 4 jours, avec I, V, VI et VII, et la formation de noyaux indurés assez persistants avec tous les autres vaccins (depuis 7 et 9 jours pour III, jusqu'à 13 jours pour un des cobayes II).

Tous ces animaux ont été éprouvés, 8 jours après la dernière vaccination, par injection intrapéritonéale d'un cent. cube d'une émulsion de jeunes bacilles, dose correspondant à environ 3 milligrammes de microbes humides (*Proteus M*). Aucun de ces cobayes n'a succombé; ils étaient tous en bon état 8 jours après, alors que trois témoins, de 425, 535 et 480 grammes, éprouvés dans les mêmes conditions, étaient morts au plus tard en 27 heures.

En résumé, nous n'avons pas éprouvé, M. D.-M. Bertrand et moi, plus de difficulté à vacciner les cobayes par voie sous-cutanée que je n'en avais eu pour immuniser les lapins par voie intraveineuse contre le même *Proteus* virulent provenant d'un cas grave de diarrhée infantile.

INTOXICATION RAPIDE PAR CERTAINS PRODUITS BACTÉRIENS CHEZ LES LAPINS EN ÉTAT D'HÉMATOLYSE

par

W. J. PENFOLD
du « Lister Institute ».

H. VIOLLE
de l'Institut Pasteur.

Hort et Penfold, en 1912 (1), ont montré que des doses non mortelles de culture de bacilles typhiques tuent les lapins, lorsqu'elles sont injectées avec une large quantité d'eau distillée. Ils montrèrent également que si l'eau est injectée dans une veine, et la dose subléthale de culture, en second lieu, dans une autre veine, la mort survient aussi. Nous apportons, dans ces notes, la preuve : 1° que les mêmes effets d'intoxication, accentués par l'eau distillée, sont obtenus avec des cultures de vibrion cholérique et beaucoup d'autres organismes, et qu'ils ne sont point dus au bouillon employé comme milieu de culture ; 2° qu'ils sont obtenus avec la toxine cholérique et n'exigent pas la présence de micro-organismes ; 3° que dans le cas de vibrion cholérique, la mort est souvent immédiate, présentant quelques analogies avec l'intoxication aiguë anaphylactique ; 4° que si la toxine est injectée d'abord, et l'eau distillée deux heures après, la mort peut survenir immédiatement ; 5° que certaines substances toxiques ne deviennent pas plus toxiques, lorsqu'on les dilue dans une grande quantité d'eau distillée ; 6° que la lyse du sang joue un rôle important dans la production de ces effets.

Nos expériences ont porté sur les lapins. Le poids des animaux a varié entre 1 kil. 800 et 2 kil. 200. Nous avons employé généralement la méthode d'injection intraveineuse.

(1) Hort et Penfold, Microorganisms and their relation to fever. *Journal of Hygiene*, 1912, vol. XII, p. 361.

Nous avons fait les expériences de contrôle, établissant :

1° L'effet des injections intraveineuses d'eau distillée, correspondant au 1/30 du poids de l'animal ;

2° L'effet des injections intraveineuses d'eau distillée, correspondant au 1/30 du poids de l'animal, additionnée de bouillon ou d'eau peptonée ;

3° L'effet des cultures pures de vibrion cholérique.

Contrôle I. — *Effet des injections intraveineuses d'eau distillée, correspondant au 1/30 du poids de l'animal.*

	POIDS du lapin	QUANTITÉ D'EAU injectée dans les veines	RÉSULTATS
	—	—	—
N° 1.	2 kil. 13	71 c. c.	Animal très bien, 14 jours après.
N° 2.	2 kil. 09	70 c. c.	Très bien.
N° 3.	2 kil. 14	71 c. c.	Très bien le jour suivant ; est employé pour d'autres injections.

L'eau employée a toujours été distillée par deux fois, et employée immédiatement après la seconde distillation.

Contrôle II. — *Effet des injections d'eau distillée, additionnée de bouillon stérile.* Le bouillon employé était légèrement alcalin au tournesol et additionné de 10 cent. cubes de soude normale par litre. Ce bouillon était identique à celui employé pour les cultures cholériques.

	POIDS des animaux	QUANTITÉ de bouillon	QUANTITÉ d'eau distillée	COEFFICIENT d'eau distillée par rapport au poids de l'animal	RÉSULTATS
	—	—	—	—	—
N° 1.	2 kil. 13	1,2 c.c.	58,8 c.c.	1/36	Animal examiné 3 jours après : très bien.
N° 2.	2 kil. 11	0,7 c.c.	70,3 c.c.	1/30	Examiné après 14 jours très bien.
N° 3.	1 kil. 95	1,95 c.c.	65 c.c.	1/30	Toujours vivant.
N° 4.	1 kil. 97	1,97 c.c.	65,6 c.c.	1/30	—
N° 5.	1 kil. 90	1,9 c.c.	63,3 c.c.	1/30	—

Contrôle III. — *Effet des injections intraveineuses de culture de vibrion cholérique (culture en bouillon de dix-huit à vingt-quatre heures).* Le vibrion employé, dans toutes nos expériences sur le choléra, est le vibrion isolé par Pottevin, à Constan-

tinople, en 1911 (1), et employé par Pottevin et Violle, en 1913, dans leurs travaux sur la production expérimentale du choléra chez les singes inférieurs (2).

	QUANTITÉ DE CULTURE absolue	QUANTITÉ DE CULTURE par kilo.	RÉSULTATS
A.	10 c.c.	3,7	Animal examiné 3 semaines après, et trouvé tout à fait bien.
B.	2,31 c.c.	1,0	Mort après 1 heure. A l'autopsie, gros kyste hydatique à l'épaule gauche.
C.	1,94 c.c.	1,0	Vivant 3 jours après.
	2,2 c.c.	1,0	» »
D.	1.73 c.c.	1,0	» »
E.	1,9 c.c.	1,0	» »
	1.76 c.c.	1.0	» »
	1,62 c.c.	1,0	» »
	1,48 c.c.	1,0	» »
F.	1,55 c.c.	1,0	» »
	2,17 c.c.	1,0	» »
G.	0,51 c.c.	0,33	» »

Les expériences précédentes furent faites avec six cultures différentes de vibrion cholérique (culture de dix-huit heures). Dans le cas de mort soudaine (voir B.), l'animal avait une infection hydatique. Le même jour, deux autres animaux (voir F.) furent injectés avec la même quantité de la même culture et ne furent point affectés par cette injection. Les accolades indiquent les séries d'animaux inoculés avec une même culture.

Des résultats précédents, il appert que : 1 cent. cube de culture cholérique, par kilogramme de lapin, n'est pas fatal chez un animal sain.

EXPÉRIENCES FAITES AVEC LE VIBRION CHOLÉRIQUE ET SA TOXINE

I. — Vibrion cholérique.

L'effet d'une injection de bouillon cholérique de dix-huit heures, diluée dans une grande quantité d'eau distillée, est montré par les expériences suivantes :

(1) H. Pottevin, *Bulletin de l'Office international d'Hygiène.*
(2) H. Pottevin et H. Violle, Choléra expérimental des singes inférieurs. *Comptes rendus de l'Acad. des sciences*, 1913, t. CLVII, p. 343.

	POIDS de l'animal	QUANTITÉ de culture par kilogr.	COEFFICIENT d'eau distillée par rapport au poids	RÉSULTATS
A.	1 kil. 51	0,43 c.c.	1/39	Mort immédiate.
	1 kil. 91	0,17 c.c.	1/96	Mort immédiate.
	1 kil. 50	0,044 c.c.	1/37	Mort immédiate.
B.	1 kil. 57	0,33 c.c.	1/30	Vivant.
	1 kil. 82	0,066 c.c.	1/30	Mort après 3 heures.
C.	1 kil. 37	0,83 c.c.	1/30	Mort après 1 h. 30 min.
	1 kil. 72	0,33 c.c.	1/30	Mort après 4 minutes.
	2 kil. 47	0,03 c.c.	1/30	Vivant.

Des résultats semblables furent obtenus, avec d'autres cultures cholériques. Il en ressort que certaines cultures peuvent produire une mort extrêmement rapide, alors que d'autres la provoquent, après un temps un peu plus long. Nous n'avons pu déterminer les causes de ces irrégularités.

II. — **Toxine cholérique.**

L'augmentation de la toxicité par l'eau distillée, dans le cas de toxine cholérique, est montrée par les expériences suivantes.

On a employé du bouillon cholérique de quatre jours, filtré au Berkefeld ; une série de lapins fut injectée avec la toxine simple, et une autre série avec la même toxine, diluée dans une quantité d'eau distillée correspondant au 1/30 du poids de l'animal.

Série I. — **Toxine seulement.**

POIDS de l'animal	QUANTITÉ de toxine par kilogr.	RÉSULTATS
1 kil. 62	7,5 c.c.	Animal survit.
1 kil. 62	5,0 c.c.	Mort après 1 h. 40.
2 kil. 27	4,0 c.c.	Mort après 2 h. 30.
1 kil. 84	4,0 c.c.	Mort après 2 h. 30.
2 kil. 10	3,0 c.c.	Mort après un jour.
1 kil. 57	3,0 c.c.	Mort après un jour.
1 kil. 58	3,0 c.c.	Mort après un jour.
1 kil. 65	3,0 c.c.	Mort après un jour.
1 kil. 60	2,0 c.c.	Mort après un jour.
1 kil. 75	2,0 c.c.	Mort après un jour.
1 kil. 50	2,0 c.c.	Mort après un jour.

Série II. — **Toxine et eau distillée.**

POIDS de l'animal	QUANTITÉ de toxine par kilogr.	EAU distillée	RÉSULTATS
1 kil. 82	0,5 c.c.	1/30	Mort immédiate.
1 kil. 70	0,5 c.c.	»	Mort après 40 minutes.
2 kil. 22	0,5 c.c.	»	Mort après 48 minutes.
2 kil. 22	0,5 c.c.	»	Mort après 50 minutes.
2 kil. 52	0,5 c.c.	»	Mort après 54 minutes.
1 kil. 71	0,5 c.c.	»	Mort après 1 h. 2 minutes.
2 kil. 25	0,5 c.c.	»	Mort après 1 h. 17 minutes.
1 kil. 73	0,5 c.c.	»	Mort après 2 heures.
1 kil. 84	0,5 c.c.	»	Mort le jour suivant.
1 kil. 76	0,1 c.c.	»	Mort immédiate.
2 kil. 10	0,1 c.c.	»	Mort après 1 h. 30 minutes.
1 kil. 71	0,1 c.c.	»	Animaux très malades immédiatement;
2 kil. 14	0,1 c.c.	»	tout à fait bien une semaine après.
1 kil. 73	0,01 c.c.	»	Mort après 1 h. 5 minutes.
1 kil. 95	0,01 c.c.	»	Mort après 2 h. 10 minutes.
1 kil. 95	0,001 c.c.	»	Vivant.
1 kil. 95	0,001 c.c.	»	Vivant.

Injections séparées de toxine cholérique et d'eau distillée.

Dans une première série d'expériences, une toxine de quatre jours fut injectée dans le péritoine de deux animaux. Deux heures après, l'eau distillée fut injectée dans les veines de l'un des animaux. Les résultats furent les suivants :

QUANTITÉ DE TOXINE par kilogramme.	EAU DISTILLÉE	RÉSULTATS
1 c.c.	1/78 du poids.	Mort immédiate.
1 c.c.	Rien.	Animal vivant.

Dans une seconde série d'expériences, l'eau distillée fut injectée en premier lieu dans les veines. La culture de choléra (de dix-huit heures) fut injectée ensuite, également, dans les veines, après des intervalles de temps différents.

EAU DISTILLÉE	CULTURE CHOLÉRIQUE par kilogramme	INTERVALLE de temps	RÉSULTATS
1/30 du poids du corps.	0,33	20 minutes.	Animal mort, après 2 h. 30
»	»	1 heure.	Très malade après l'inj.
»	»	1 h. 10 m.	Mort le jour suivant.
»	»	2 heures.	» » »
»	»	18 heures.	Vivant.

L'injection de toxine cholérique dans le péritoine, suivie de l'administration d'eau distillée, en grande quantité, dans l'estomac, n'a provoqué aucune augmentation d'intoxication chez les trois animaux en expérience.

Chez deux paires d'animaux, nous avons essayé de prévenir les phénomènes aigus d'intoxication produits par l'injection de cultures cholériques, diluées dans l'eau distillée, en administrant, par voie intraveineuse, et immédiatement avant l'injection de toxine, une solution concentrée de chlorure de sodium. Les résultats furent les suivants :

		SOLUTION SALÉE à 5 p. 100	CULTURE CHOLÉRIQUE par kilogramme	EAU DISTILLÉE	RÉSULTATS
		—	—	—	—
I.	1	20 c.c.	0,38 c.c.	1/43 du poids du corps.	Mort après 2 heures.
	2	Rien.	0,38 c.c.	1/43	Mort immédiate.
II.	1	20 c.c.	0,33 c.c.	1/30	Mort après 3 h. 30
	2	Rien.	0,33 c.c.	1/30	Mort après 3 heures.

D'où l'on peut conclure que la solution saline hypertonique est impuissante à prévenir l'intoxication.

Dans les cas d'intoxication aiguë, provoquée par la toxine cholérique en dilution dans l'eau distillée, les animaux présentent de la paralysie débutant dans l'avant ou l'arrière-train, du coma, des convulsions avec opisthotonos et exophthalmie.

A l'autopsie, on trouve une congestion intense du système porte, spécialement marquée dans l'intestin grêle. Le péritoine contient un peu de sérosité sanglante. Les urines sont teintées en rouge. Le sérum sanguin est coloré. Le cœur droit contient généralement un caillot. Les poumons sont d'apparence normale.

Des tentatives d'immunisation contre la toxine cholérique, diluée en eau distillée, ne nous ont donné aucun résultat satisfaisant.

Le sérum normal et le sérum anticholérique ordinaire sont tout à fait insuffisants, pour prévenir l'intoxication suraiguë résultant d'une injection de culture ou de toxine cholériques, en eau distillée, soit que ces substances aient été injectées avant ou après le sérum.

A quoi est due l'augmentation de toxicité? C'est ce que nous examinerons plus loin.

EXPÉRIENCES FAITES AVEC D'AUTRES BACTÉRIES

Deux expériences, faites avec des cultures en bouillon de *Proteus vulgaris*, ont donné les résultats suivants :

1° Injection de culture de vingt-quatre heures, diluée dans l'eau distillée.

POIDS des animaux	CULTURE par kilogr.	EAU DISTILLÉE	RÉSULTATS
1 kil. 60	0,33 c.c.	1/30	Animal mort après 30 minutes.
2 kil. 06	0,033 c.c.	1/30	Mort après 2 heures.
2 kil. 43	0,0033 c.c.	1/30	Mort après 2 heures.

Contrôles (sans eau distillée) :

2 kil. 14	2,0 c.c.	Rien.	Animal vivant.
1 kil. 35	0,33 c.c.	Rien.	Animal vivant.

2° Injection sous-cutanée, chez deux animaux, de culture de quarante-huit heures, et suivie, chez un animal, d'injection intraveineuse d'eau distillée.

POIDS des animaux	CULTURE par kilogr.	EAU DISTILLÉE (après 3 h. 30)	RÉSULTATS
3 kil. 01	2,5 c.c.	1/134 du poids du corps.	Animal mort après 4 minutes.
2 kil. 87	2,5 c.c.	Rien.	Animal vivant.

Les cultures de bacille *pyocyanique*, données avec puis sans eau, ont fourni les résultats suivants :

POIDS des animaux	CULTURE par kilogr.	EAU DISTILLÉE	RÉSULTATS
2 kil. 29	0,33 c.c.	1/30 du poids du corps.	Animal mort après 2 heures.
3 kil. »	1,0 c.c.	Rien.	Vivant.

Les cultures de bacille *dysentérique* (culture de vingt-quatre heures), données avec eau, puis sans eau, ont fourni les résultats suivants :

POIDS des animaux	CULTURE par kilogr.	EAU DISTILLÉE	RÉSULTATS
2 kil. 31	0,7 c.c.	1/30	Animal mort après 1 h. 30.
2 kil. 47	0,7 c.c.	Rien.	Vivant.

Les cultures de bacille *prodigiosus* ont donné des résultats analogues.

Le bacille du *choléra des poules*, très pathogène pour les lapins, les tua en douze heures, après l'injection intraveineuse; néanmoins, l'addition, à la culture, d'eau distillée est capable d'accélérer l'intoxication et de causer la mort soudaine :

Un lapin de 2 kil. 45 reçoit 0,33 cent. cube, par kilogramme, d'une culture en bouillon de choléra des poules, de vingt-quatre heures, en injection intraveineuse; 1 h. 45 min. après, il reçoit 20 cent. cubes d'eau distillée, et meurt immédiatement.

La *tuberculine de Koch* (tuberculine vétérinaire), injectée avec eau, puis sans eau, a donné les résultats suivants :

QUANTITÉ PAR KILOGR.	EAU DISTILLÉE	RÉSULTATS
2,5 c.c.	1/30 du poids du corps.	Animal mort après 5 heures.
1,0 c.c.	1/30	Vivant.
0,1 c.c.	1/30	Vivant.
5,0 c.c.	Rien.	Vivant (quelques convulsions immédiatement après l'inj.).
2,5 c.c.	Rien.	Vivant.

L'effet toxique de la tuberculine paraît seulement un peu augmenté par cette méthode.

Les expériences suivantes, faites avec du bouillon de vingt-quatre heures, pour chacune des bactéries employées, n'ont pas amené chez les animaux la mort immédiate :

	POIDS	QUANTITÉ de culture par kil.	EAU distillée	RÉSULTATS
B. du Charbon. .	1 kil. 9	0,33 c.c.	1/30	Mort en 2 jours.
	1 kil. 74	0,33 c.c.	Rien.	Mort en 3 jours.
B. subtilis. . . .	2 kil. 06	0,33 c.c.	1/30	Vivant.
	2 kil. 12	0,066 c.c.	1/30	Vivant.
B. Pneumocoque.	2 kil. 23	0,33 c.c.	1/30	Vivant.
	2 kil. 32	0,066 c.c.	1/30	Vivant.

EXPÉRIENCES FAITES AVEC DIVERS POISONS

Cyanure de potassium. — Un cent. cube, par kilogramme, d'une solution en eau distillée à 1 p. 100 de cyanure de potassium, fut injecté intraveineusement à un lapin de 1 kil. 37 : l'animal mourut immédiatement. Un cent. cube, par kilogramme, d'une solution à 0,1 p. 100, fut donné à un second lapin de 1 kil. 86 : l'animal entra en convulsions, puis dans le coma, et revint à la vie après une demi-heure. Un troisième lapin, de 1 kil. 77, reçut 1 cent. cube, par kilogramme, d'une solution à 0,1 p. 100 de cyanure de potassium, dans une masse d'eau distillée équivalente à 1/30 de son poids : l'animal ne présente ni convulsions ni coma, mais reste inerte pendant dix minutes. Cette dilution paraît avoir rendu la substance chimique moins toxique. Deux autres lapins reçurent 1 cent. cube, par kilogramme, d'une solution à 0,01 pour 100 de cyanure de potassium ; à l'un, il fut ajouté de l'eau distillée (1/30 de son poids) : aucun effet d'augmentation d'intoxication ne fut remarqué chez l'un et l'autre des animaux.

Strychnine. — Avec la strychnine on ne remarque, de même, aucun effet d'accroissement d'intoxication.

SUR LA CAUSE DE LA TOXOHÉMATOLYSE

Les expériences suivantes ont eu pour but de rechercher la cause de l'augmentation de toxicité due à l'action combinée de l'eau distillée et d'un produit bactérien. On a employé toujours les injections intraveineuses.

I. *Globules rouges.* — 1° Dix cent. cubes de sang normal de lapin sont lysés dans 20 cent. cubes d'eau distillée ; on donne, par kilogramme d'animal, 10 cent. cubes de ce mélange à deux lapins ; on ajoute 1 cent. cube, par kilogramme d'animal, d'une culture cholérique de dix-huit heures en bouillon, à l'un des deux animaux. Celui qui a reçu le mélange, plus la culture cholérique, meurt en deux minutes, l'autre reste vivant. Un cent. cube de culture cholérique de dix-huit heures, seule, par kilogramme d'animal, est une dose subléthale.

2° Du sang de lapin est lysé, dans deux fois sa quantité d'eau distillée ; on donne 3 cent. cubes du mélange, par kilogramme, à une paire de lapins ; à l'un des deux, on ajoute 1 cent. cube, par kilogramme, de culture cholérique de dix-huit heures. Ce dernier reste dans le coma, durant une demi-heure, mais il revient peu à peu à la santé. Le témoin ne subit aucune atteinte.

3° Une paire d'animaux reçoit, l'un du sang lysé, l'autre du sang lysé additionné de culture cholérique, en quantité subléthale. Le contrôle (sang lysé seulement) reste tout à fait bien portant, mais l'animal qui a reçu le mélange (sang lysé et culture cholérique) meurt.

Ces expériences suggèrent que la lyse du sang est un facteur important d'augmentation de la toxicité ; mais cette lyse est obtenue par l'eau distillée, de telle sorte que la pression osmotique du sang, après l'injection, est plus faible que normalement : c'est pourquoi nous avons pensé que la lyse du sang, par l'éther, pouvait supprimer cet inconvénient.

Dans les expériences suivantes, le sang est lysé par l'éther, et l'éther complètement chassé par le vide.

POIDS de l'animal	SANG LYSÉ par l'éther	CULTURE CHOLÉRIQUE de dix-huit heures	SOLUTION saline	RÉSULTATS
kil. »	2,0 c.c.	Rien.	Rien.	Animal vivant.
1 kil. 7	1,7 c.c.	1,7 c.c.	56,6 c.c.	Mort durant la nuit. Coma après 2 heures.
1 kil. 9	1,9 c.c.	1,9 c.c.	Rien.	Mort après 2 heures.

Une seconde expérience, faite dans les mêmes conditions, a donné les résultats suivants :

POIDS de l'animal	SANG LYSÉ par l'éther	VIBRION CHOLÉRIQUE	RÉSULTATS
1 kil. 04	1,04 c.c.	Rien.	Animal vivant.
1 kil. 96	1,96 c.c.	Rien.	Vivant.
1 kil. 93	1,93 c.c.	1,93 c.c.	Mort après 2 heures.
2 kil. 26	2,26 c.c.	2,26 c.c.	Mort après 2 h. 35.

De ces expériences, nous pouvons conclure que la lyse du sang joue en effet un rôle important dans la sensibilisation d'un animal au poison bactérien par l'eau distillée.

15 cent. cubes de sang de lapin ont été défibrinés et lavés deux fois, dans une solution d'eau physiologique. La quantité finale de globules rouges était de 4,5 cent. cubes; 13 cent. cubes d'eau distillée furent ajoutés pour obtenir l'hémolyse. Le mélange fut injecté à des animaux, avec ou sans culture cholérique.

POIDS DES ANIMAUX	SANG LYSÉ	CULTURE CHOLÉRIQUE	RÉSULTATS
1 kil. 70	4 c.c. par kil.	1 c.c. par kil.	Mort en 3 heures.
1 kil. 95	4 c.c. par kil.	Rien.	Vivant.

Cette expérience fut refaite une seconde fois, et donna le même résultat. Il apparaît que la lyse des globules rouges du sang est au moins une des causes de l'augmentation de l'action toxique.

II. *Sérum.* — L'action du sérum fut essayée dans l'expérience suivante : un lapin de 2 kil. 9 reçoit, dans les veines, le mélange suivant : 4,35 cent. cubes de sérum frais de lapin, dilué dans 97 cent. cubes d'eau distillée (1/30 du poids du lapin); on ajoute 1,45 cent. cube de culture cholérique (de vingt-sept heures, à 37 degrés) et du chlorure de sodium, en quantité suffisante, pour faire la solution isotonique. Le mélange est injecté : l'animal survit.

Une autre expérience fut faite, équivalente à la précédente, mais l'eau distillée ajoutée était seulement égale à deux fois le volume de sérum : l'animal qui reçut cette injection ne présenta aucun signe d'intoxication. Il est donc probable que la lyse des éléments cellulaires du sang joue un rôle plus important que le sérum.

III. *Globules blancs.* — Afin de déterminer le rôle joué par les leucocytes, nous avons injecté, à des animaux, un mélange de leucocytes (obtenu d'un exsudat intrapéritonéal de lapin) d'eau distillée et de culture cholérique (de trente-six heures), et du chlorure de sodium, en quantité suffisante, pour rendre le mélange isotonique; ce mélange est injecté dans les conditions suivantes :

Poids de l'animal	1 kil. 900
Exsudat, par kilogramme	3,0 c.c.
Culture cholérique, par kilogramme.	1,0 c.c.
Eau distillée	1/60 du poids du corps.
Chlorure de sodium	Q. S.

L'animal survécut et ne montra aucun symptôme grave.

L'expérience fut répétée une seconde fois, et donna les mêmes résultats.

Il paraît en résulter que le rôle joué par les leucocytes, dans la production de ce phénomène d'accroissement de l'intoxication, est insignifiant, comparativement à celui qui est tenu par les globules rouges.

De ces expériences, nous pouvons conclure que l'organisme est sensibilisé à certains produits bactériens par l'hématolyse. Nous proposons pour désigner ce phénomène, dû à deux facteurs insuffisants, lorsqu'ils sont isolés, pour déterminer la mort, mais dont la réunion est suffisante pour la provoquer, le nom de « *Toxohématolyse* », qui indique la coordination de cette action.

Conclusions.

1° L'organisme est sensibilisé à certains produits bactériens, y compris les vibrions cholériques, par l'action de l'eau distillée.

2° Cette sensibilisation, par l'eau distillée, se manifeste de même avec la toxine cholérique, c'est-à-dire lorsque tout organisme vivant est exclu.

3° L'intoxication, produite par la toxine ou la culture cholériques diluées dans l'eau distillée, est aiguë, et la mort peut survenir immédiatement.

4° La mort aiguë apparaît également si la culture ou la toxine cholériques ont été données en premier lieu, et l'eau distillée ensuite ; la toxine cholérique peut être injectée par une voie autre que la voie intraveineuse.

5° Une injection préventive, de solution saline concentrée, n'a que peu d'effets contre cette intoxication.

6° L'augmentation de l'effet toxique, par l'addition d'eau distillée, apparaît avec le *Proteus vulgaris*, le bacille pyocyanique, le bacille dysentérique (Shiga), le *Bacillus prodigiosus*, et aussi, mais faiblement, avec la tuberculine ; on ne l'observe point avec les poisons minéraux, tels que le cyanure de potassium, et les alcaloïdes, tels que la strychnine.

7° L'injection, en petite quantité, de sang lysé et de dose subléthale de culture cholérique produit la mort aiguë.

8° La lyse des cellules rouges paraît être le facteur le plus important dans la production de cet effet.

9° Nous proposons, pour désigner ce phénomène, produit par la coordination des deux facteurs, nécessaires et suffisants, le nom de « toxohématolyse ».

TABLE DES MATIÈRES

Activation de la toxine tétanique, par A. Marie. 1
Action des abcès de fixation sur la trypanosomiase expérimentale du cobaye et sur son traitement par l'atoxyl, par A. Ciuca (de Bucarest) 6
Recherches de physiologie végétale (4e mémoire). Influences respectives des éléments de la solution minérale sur le développement du maïs, par P. Mazé (avec les planches I et II). 21
Étude de la chlorose des végétaux supérieurs attribuée à la richesse excessive des sols en calcaire, par P. Mazé, M. Ruot et M. Lemoigne (avec les planches III et IV). 47
Sur l'évolution culturale des dermatophytes, par L. Cazalbou. 69
Études sur la flore intestinale (4e mémoire). Les diarrhées des nourrissons, par El. Metchnikoff (avec les planches V à VIII). 89
Recherches sur la flore intestinale dans la diarrhée des nourrissons, par D.-M. Bertrand. 121
Recherches sur la flore intestinale. Nouvelles données expérimentales sur le rôle pathogène de certaines associations microbiennes, par Albert Berthelot. . . 132
Essais de stérilisation des spores charbonneuses, par Georges Abt. 149
Lésions du système nerveux dans l'intoxication vermineuse, par A. Rachmanow (avec la planche IX). . . . 181
Influence de différentes espèces de saccharomyces sur milieux artificiels et naturels, par Jules Ventre . . . 194
Études sur les staphylocoques dorés. I. — Parallèle entre divers staphylocoques dorés d'origine humaine et animale, par J. Dumas 213
Études sur les staphylocoques dorés. II. — Toxicité des échantillons étudiés dans le travail précédent. Vue d'ensemble sur les staphylocoques dorés, par M. Nicolle et E. Césari 219

18666

Recherches histologiques sur les glandes salivaires de la rage, par Y. Manouélian (avec les planches X et XI). . 233
Essais de Chimiothérapie. Combinaisons des sels d'argent et des composés arsenicaux dans le traitement des trypanosomiases expérimentales et de la syphilis chez l'homme, par J. Danysz. 238
Influence de différentes espèces de saccharomyces sur milieux artificiels et naturels, par Jules Ventre (2e partie). 257
Le coccobacille des sauterelles, par F. d'Herelle 280
Contribution à l'étude de l'immunité antituberculeuse chez les bovidés, par A. Calmette et C. Guérin. 329
Contribution à l'étude de la réaction de fixation de Bordet-Gengou au cours de l'infection et de l'immunisation tuberculeuse, par A. Calmette et L. Massol 338
Méningite par injection de microbes pyogènes dans les nerfs périphériques par C. Levaditi, V. Danulesco et L. Arzt (avec la planche XII). 356
Étude expérimentale sur la cénurose du lapin, par A. Henry et A. Cicca 365
Le coccobacille des sauterelles, par F. d'Herelle (*fin*). . 387
Essai de destruction des sauterelles en Algérie par le *Coccobacillus acridiorum* de d'Herelle, par Edmond Sergent et Albert Lhéritier. 408
Recherches expérimentales sur une méthode thérapeutique basée sur la stimulation des phagocytes, par T. Yamanouchi. 420
Influence de la lécithine et de la cholestérine sur la toxicité des œufs et des ovaires, par Henri Vignes 437
Sur la flore intestinale des chauves-souris, par Mlle Tsiklinsky (avec la planche XIII). 441
Influence du mode de pénétration cutanée ou buccale du *Stephanurus dentatus* sur les localisations de ce nématode dans l'organisme du porc et sur son évolution, par P.-Noël Bernard et J. Bauche (avec la planche XIV). 450
Recherches biologiques sur l'éosinophilie, par M. Weinberg et P. Seguin (1er mémoire) [avec les pl. XV et XVI]. 470
La Neuronophagie dans la Poliomyélite, par C. Levaditi et J. Pignot (avec la planche XVII). 509

Le sang de la poule dans la spirillose expérimentale, par L. Launoy et M. Lévy Bruhl (avec la planche XVIII). 517
Traitement vaccinothérapique de la fièvre typhoïde, par E. Boinet (1re partie) 540
Note sur le *Bacillus perfringens* (Veillon), par Mlle A. Raphael. 564
De la réaction de fixation chez les tuberculeux par A. Besredka et J. Manoukhine.. 569
La Gélose à l'œuf, par A. Besredka et F. Jupille 576
Recherches sur le Plexus cardiaque et sur l'innervation de l'aorte, par Y. Manouélian (avec les pl. XIX et XX). 579
A propos des théories nouvelles sur la pathogénie de l'angine de poitrine, par Y. Manouélian 582
Remarque à propos de l'existence des centres nerveux dans les organes, par Y. Manouélian. 584
Études sur le bacille de Malassez et Vignal. La pseudo-tuberculose du cobaye, maladie naturelle et maladie expérimentale, par G. Ramon. 585
Traitement vaccinothérapique de la fièvre typhoïde, par E. Boinet (2e partie). 597
Études sur la ricine. III. — Hypersensibilité à la ricine, par E. Alilaire 605
Teneur bacillaire et conditions de pulvérisabilité de la salive et des crachats tuberculeux par les courants aériens, par P. Chaussé (1er mémoire). 608
Recherches expérimentales sur les réactions anaphylactiques produites par les albuminoïdes du cristallin, par V. Morax et J. Bollack. 625
La flore intestinale des lapins nourris de carottes et des lapins soumis à l'inanition, par D. Rougentzoff . . . 639
Action de la toxine diphtérique sur le rat, par A. Pettit. 663
Étude morphologique et biologique sur *Trypanosoma Pecaudi*, par Ogawa. 677
Sur quelques produits de la décomposition du dextrose en milieu alcalin, par A. Fernbach et M. Schoen. . . 692
Action des acides sur la fermentation alcoolique, par M. et Mme Rosenblatt (2e mémoire) 714
Le tuberculeux peut-il émettre des particules liquides respirables? par P. Chaussé (2e mémoire). 720

L'influence de la réaction du milieu sur l'action de l'inulase de l'*Aspergillus niger*, par A. Kiesel. 747
Essais sur la pathogénie du choléra, par H. Violle. . . . 759
Recherches complémentaires sur la contagion tuberculeuse auprès du malade, et en dehors de l'habitation, par P. Chaussé (3e mémoire). 771
Du rôle physiologique joué par le *Bacillus bifidus* dans le canal intestinal, par Carl A. Kling. 797
Sur un ferment contenu dans les eaux, agent de déshydratation de la glycérine, par E. Voisenet 807
Études sur la ricine. IV. — Recherche de la ricine (toxine et agglutinine) dans les différentes espèces et variétés de ricin, par Henri Agulhon 819
Les leishmanioses chez les animaux, par A. Laveran. . . 823
Recherches sur le *Proteus vulgaris*, par Albert Berthelot. 839
L'indépendance de la température optimale d'une diastase à l'égard de la concentration en substrat et en diastase, par Arthur Compton. 867
Contribution à l'étude du gonocoque, par P. Forgeot . . . 879
Les leishmanioses chez les animaux, par Laveran (*suite*). 885
Recherches sur le *Proteus vulgaris*, par A. Berthelot (*fin*). 909
Intoxication rapide par certains produits bactériens chez les lapins en état d'hématolyse, par W.-J. Penfold et H. Violle 930

TABLE DES PLANCHES

Pl. I à IV. . . . . Mémoire de M. P. Mazé 21
Pl. V à VIII. . . . . — M. Él. Metchnikoff. 89
Pl. IX. . . . . — M. A. Rachmanow 181
Pl. X et XI. . . . . — M. Y. Manouélian 233
Pl. XII . . . . . — MM. C. Levaditi, V. Danulesco et L. Arzt. 356
Pl. XIII . . . . . — Mlle Tsiklinsky 441
Pl. XIV . . . . . — MM. P.-N. Bernard et J. Bauche. 450
Pl. XV et XVI . . . — MM. Weinberg et P. Seguin . . 470
Pl. XVII. . . . . — MM. C. Levaditi et J. Pignot . . 509
Pl. XVIII . . . . . — MM. L. Launoy et M. Lévy Bruhl. 517
Pl. XIX et XX . . . — M. Y. Manouélian. 579

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

ABT (Georges) . . . . . Essais de stérilisation des spores charbonneuses 149

AGULHON (Henri) . . . . . Etudes sur la ricine. IV. — Recherche de la ricine (toxine et agglutinine) dans les différentes espèces et variétés de ricin. 819

ALILAIRE (E.) . . . . . Etudes sur la ricine. III. — Hypersensibilité à la ricine. 605

ARZT (L.), LEVADITI (C.) et DANULESCO (V.) . . . . . Méningite par injection de microbes pyogènes dans les nerfs périphériques (avec la planche XII) 356

BAUCHE (J.) et BERNARD (P.-Noël). . . . . Influence du mode de pénétration, cutanée ou buccale, du *Stephanurus dentatus* sur les localisations de ce nématode dans l'organisme du porc et sur son évolution (avec la planche XIV) 450

BERNARD (P.-Noël) et BAUCHE (J.) . . . . . Influence du mode de pénétration, cutanée ou buccale, du *Stephanurus dentatus* sur les localisations de ce nématode dans l'organisme du porc et sur son évolution (avec la planche XIV). 450

BERTHELOT (Albert) . . . . Recherches sur la flore intestinale. Nouvelles données expérimentales sur le rôle pathogène de certaines associations microbiennes 132

— . . . . . Recherches sur le *Proteus vulgaris*. 839, 909

BERTRAND (D.-M.) . . . . . Recherches sur la flore intestinale dans la diarrhée des nourrissons 121

BESREDKA (A.) et MANOUKHINE (J.). . . . . De la réaction de fixation chez les tuberculeux 569

— et JUPILLE (F.). . . . La gélose à l'œuf 576

BOINET (E.). . . . . Traitement vaccinothérapique de la fièvre typhoïde 540, 597

BOLLACK (J.) et MORAX (V.). Recherches expérimentales sur les réactions anaphylactiques produites par les albuminoïdes du cristallin. . . . 625

CALMETTE (A.) et GUÉRIN (C.). Contribution à l'étude de l'immunité antituberculeuse chez les bovidés . . 329

— et MASSOL (L.) . . . . Contribution à l'étude de la réaction de fixation de Bordet-Gengou au cours de l'infection et de l'immunité tuberculeuse 338

CAZALBOU (L.) . . . . . Sur l'évolution culturale des dermatophytes. 69

CÉSARI (E.) et NICOLLE (M.). Etudes sur les staphylocoques dorés. II. — Toxicité des échantillons étudiés dans le travail précédent [de Dumas]. Vue d'ensemble sur les staphylocoques dorés 219

CHAUSSÉ (P.) . . . . . Teneur bacillaire et conditions de pulvérisabilité de la salive et des crachats tuberculeux par les courants aériens (1er mémoire) 608

— . . . . . Le tuberculeux peut-il émettre des particules liquides respirables? (2e mémoire). 720

— . . . . . Recherches complémentaires sur la contagion tuberculeuse auprès du malade et en dehors de l'habitation (3e mémoire). 771

CIUCA (A.) (de Bucarest) . Action des abcès de fixation sur la trypanosomiase expérimentale du cobaye et sur son traitement par l'atoxyl. . 6

— et HENRY (A.) . . . . Etude expérimentale sur la cénurose du lapin. 365

COMPTON (Arthur). . . . . L'indépendance de la température optimale d'une diastase à l'égard de la concentration en substrat et en diastase. 869

DANULESCO (V.), LEVADITI (C.) et ARZT (L.) . . . . Méningite par injection de microbes pyogènes dans les nerfs périphériques (avec la planche XII) 356

DANYSZ (J.). . . . . Essais de Chimiothérapie. Combinaisons des sels d'argent et des composés arsenicaux dans le traitement des trypanosomiases expérimentales et de la syphilis chez l'homme 238

DUMAS (J.) . . . . . Etudes sur les staphylocoques dorés. I. — Parallèle entre divers staphylo-

coques dorés d'origine humaine et animale 213

FERNBACH (A.) et SCHOEN (M.) . . . . . Sur quelques produits de la décomposition du dextrose en milieu alcalin 692

FORGEOT (P.) . . . . . Contribution à l'étude du gonocoque . 879

GUÉRIN (C.) et CALMETTE (A.). Contribution à l'étude de l'immunité antituberculeuse chez les bovidés . . 329

HÉRELLE (F. D') . . . . . Le coccobacille des sauterelles. . 280, 387

HENRY (A.) et CIUCA (A.) . Etude expérimentale sur la cénurose du lapin. 365

JUPILLE (F.) et BESREDKA (A.). La gélose à l'œuf 576

KIESEL (A.). . . . . L'influence de la réaction du milieu sur l'action de l'inulase de l'*Aspergillus niger* 747

KLING (Carl A.) . . . . . Du rôle physiologique joué par le *Bacillus bifidus* dans le canal intestinal . . . 797

LAUNOY (L.) et LÉVY BRUHL (M.) . . . . . Le sang de la poule dans la spirillose expérimentale (avec la planche XVIII). 517

LAVERAN (A.) . . . . . Les leishmanioses chez les animaux. 823, 885

LEMOIGNE (M.), MAZÉ (P.) et RUOT (M.) . . . . . Recherches de physiologie végétale (4e mémoire). Étude de la chlorose des végétaux supérieurs attribuée à la richesse excessive des sols en calcaire (avec les planches III, IV) . . . 47

LEVADITI (C.), DANULESCO (V.) et ARZT (L.) . . . . . Méningite par injection de microbes pyogènes dans les nerfs périphériques (avec la planche XII) 356

— et PIGNOT (I.). . . . La neuronophagie dans la poliomyélite (avec la planche XVII). 509

LÉVY BRUHL (M.) et LAUNOY (L.) . . . . . Le sang de la poule dans la spirillose expérimentale (avec la planche XVIII). 517

LHÉRITIER (Albert) et SERGENT (Edmond). . . . . Essai de destruction des sauterelles en Algérie par le *Coccobacillus acridiorum* de d'Hérelle. 408

MANOUÉLIAN (Y.) . . . . . Recherches histologiques sur les glandes salivaires dans la rage (avec les planches X et XI.) 233

— . . . . . Recherches sur le plexus cardiaque et sur l'innervation de l'aorte (avec les planches XIX et XX) 579

MANOUÉLIAN (Y.) . . . . . A propos des théories nouvelles sur la pathogénie de l'angine de poitrine . . 582
. . . . . Remarques à propos de l'existence des centres nerveux dans les organes . . 584
MANOUKHINE (I.) et BESREDKA (A.) . . . . . De la réaction de fixation chez les tuberculeux 569
MARIE (A.) . . . . . Activation de la toxine tétanique . . . 1
MASSOL (L.) et CALMETTE (A.). Contribution à l'étude de la réaction de fixation de Bordet-Gengou au cours de l'infection et de l'immunisation tuberculeuse. 338
MAZÉ (P.). . . . . Recherches de physiologie végétale (4e mémoire). Influences respectives des éléments de la solution minérale sur le développement du maïs (avec les planches I et II). 21
— RUOT (M.) et LEMOIGNE (M.) . . . . . Recherches de physiologie végétale (4e mémoire). Étude de la chlorose des végétaux supérieurs attribuée à la richesse excessive des sols en calcaire (avec les planches III et IV) . . 47
METCHNIKOFF (El.) . . . . . Études sur la flore intestinale (4e mémoire). Les diarrhées des nourrissons [avec les planches V à VIII]. 89
MORAX (V.) et BOLLACK (J.). Recherches expérimentales sur les réactions anaphylactiques produites par les albuminoïdes du cristallin. 625
NICOLLE (Maurice) et CÉSARI (E.) . . . . . Etudes sur les staphylocoques dorés. II. — Toxicité des échantillons étudiés dans le travail précédent [de Dumas]. Vue d'ensemble sur les staphylocoques dorés 219
OGAWA . . . . . Étude morphologique et biologique sur *Trypanosoma Pecaudi* 677
PENFOLD (W.-J.) et VIOLLE (H.) . . . . . Intoxication rapide par certains produits bactériens chez les lapins en état d'hématolyse 930
PETTIT (Auguste) . . . . . Action de la toxine dipthérique sur le rat. 663
PIGNOT (J.) et LEVADITI (C.). La neuronophagie dans la poliomyélite (avec la planche XVII) 509
RACHMANOW (A.). . . . . Lésions du système nerveux dans l'intoxication vermineuse (avec la pl. IX). 181
RAMON (G.) . . . . . Études sur le bacille de Malassez et

Vignal. La pseudo-tuberculose du cobaye. (Maladie naturelle et maladie expérimentale) 585
RAPHAEL (Mlle A.) . . . . . Note sur le *Bacillus perfringens* (Veillon). 564
ROSENBLATT (M. et Mme) . . Action des acides sur la fermentation alcoolique (2e mémoire) 714
ROUGENTZOFF (D.) . . . . La flore intestinale des lapins nourris de carottes et des lapins soumis à l'inanition 639
RUOT (M.), MAZÉ (P.) et LEMOIGNE (M.) . . . . . Recherches de physiologie végétale (4e mémoire). Étude de la chlorose des végétaux supérieurs attribuée à la richesse excessive des sols en calcaire (avec les planches III, IV) . . . 47
SCHOEN (M.) et FERNBACH (A.). Sur quelques produits de la décomposition du dextrose en milieu alcalin. . 692
SÉGUIN (P.) et WEINBERG (M.). Recherches biologiques sur l'éosinophilie (1er mémoire) [avec les planches XV et XVI.] 470
SERGENT (Edmond) et LHÉRITIER (Albert) . . . . . Essai de destruction des sauterelles en Algérie par le *Coccobacillus acridiorum* de d'Hérelle 408
TSIKLINSKY (Mlle) . . . . . Sur la flore intestinale des chauves-souris (avec la planche XIII.) 441
VENTRE (Jules) . . . . . Influence de différentes espèces de saccharomyces sur milieux artificiels et naturels 194, 257
VIGNES (Henri) . . . . . Influence de la lécithine et de la cholestérine sur la toxicité des œufs et des ovaires 437
VIOLLE (H.) . . . . . Essais sur la pathogénie du choléra . . 759
VIOLLE (H.) et PENFOLD (W.-J.). Intoxication rapide par certains produits bactériens chez les lapins en état d'hématolyse 930
VOISENET (E.) . . . . . Sur un ferment contenu dans les eaux, agent de déshydratation de la glycérine 807
WEINBERG (M.) et SÉGUIN (P.). Recherches biologiques sur l'éosinophilie (1er mémoire) [avec les planches XV et XVI.] 470
YAMANOUCHI (T.) . . . . . Recherches expérimentales sur une méthode thérapeutique basée sur la stimulation des phagocytes 420

Le Gérant : G. MASSON.

Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette.

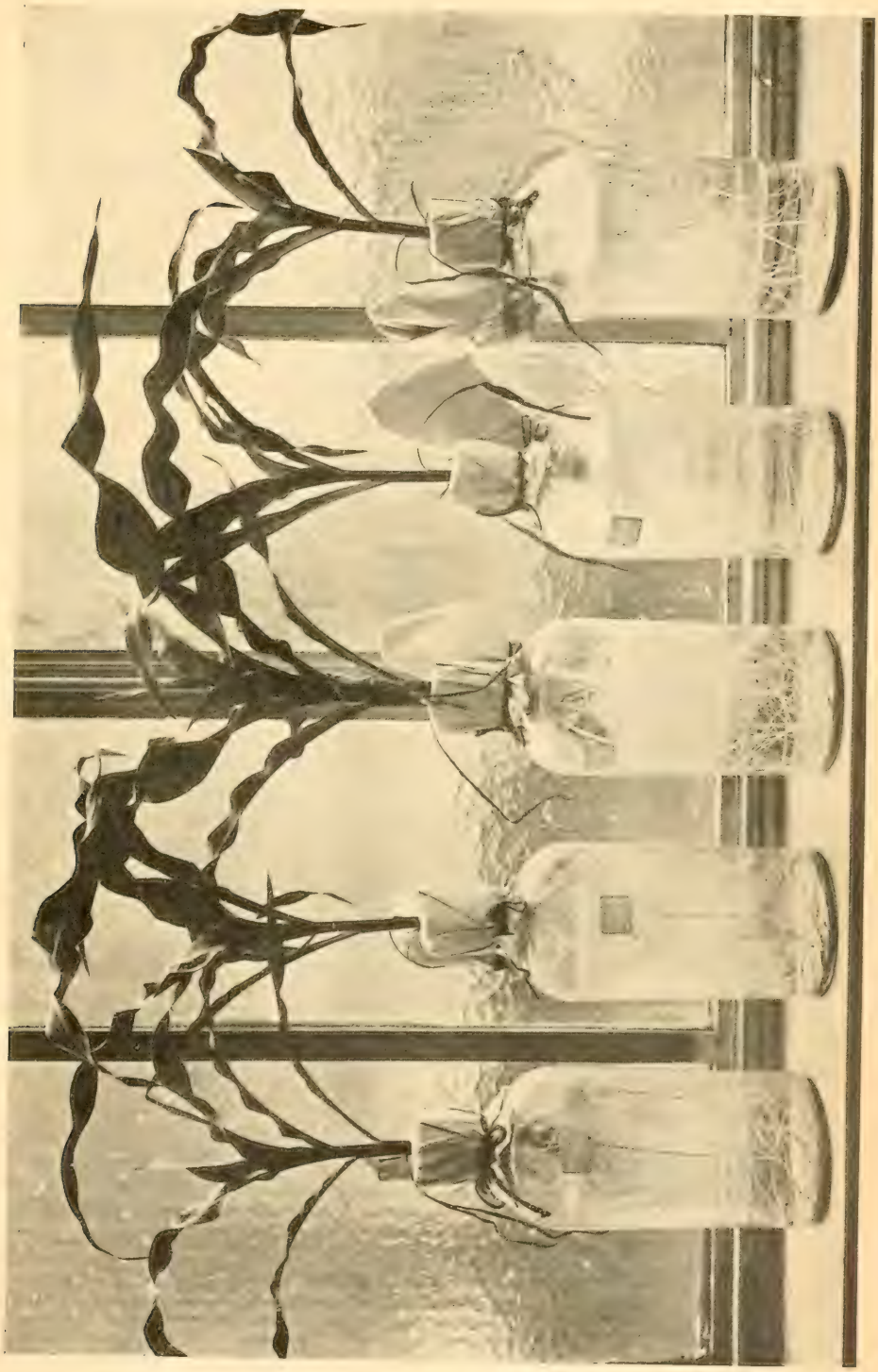


Fig. 1

Fig 2

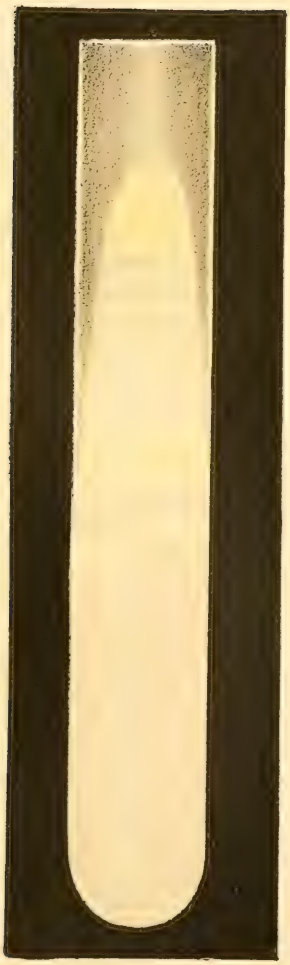


Fig. 3

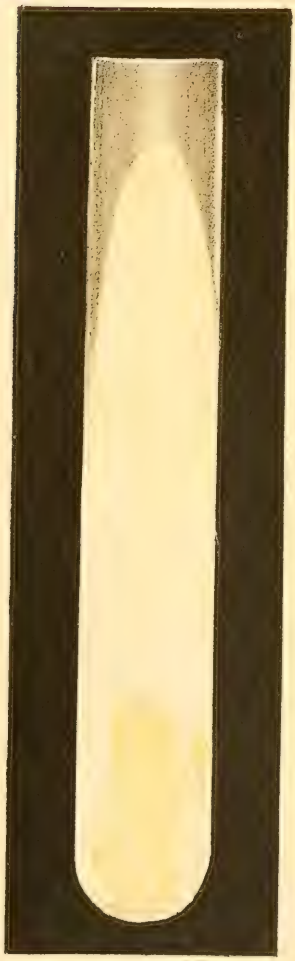


Fig. 4

El. Metchnikoff del.

Constantin lith.

Imp. L. Lafontaine

El. Metchnikoff del.

Imp. L. Lafontaine

Constantin lith.

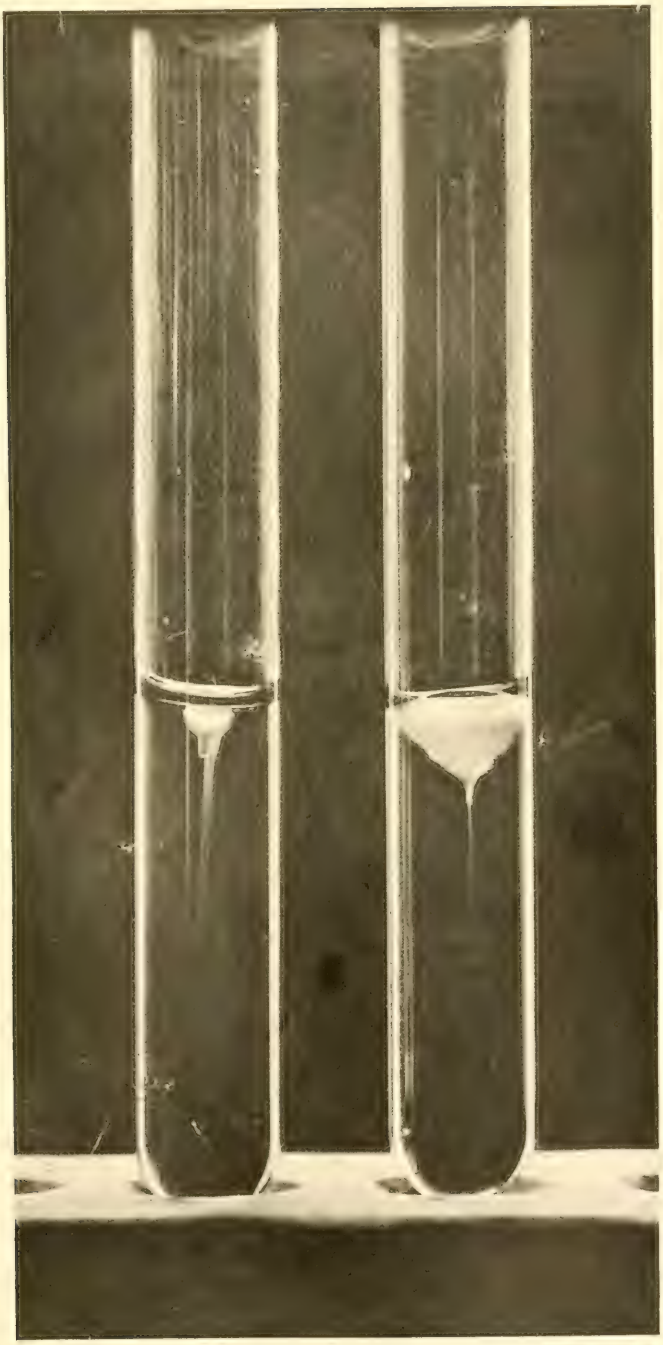
Fig. 15.

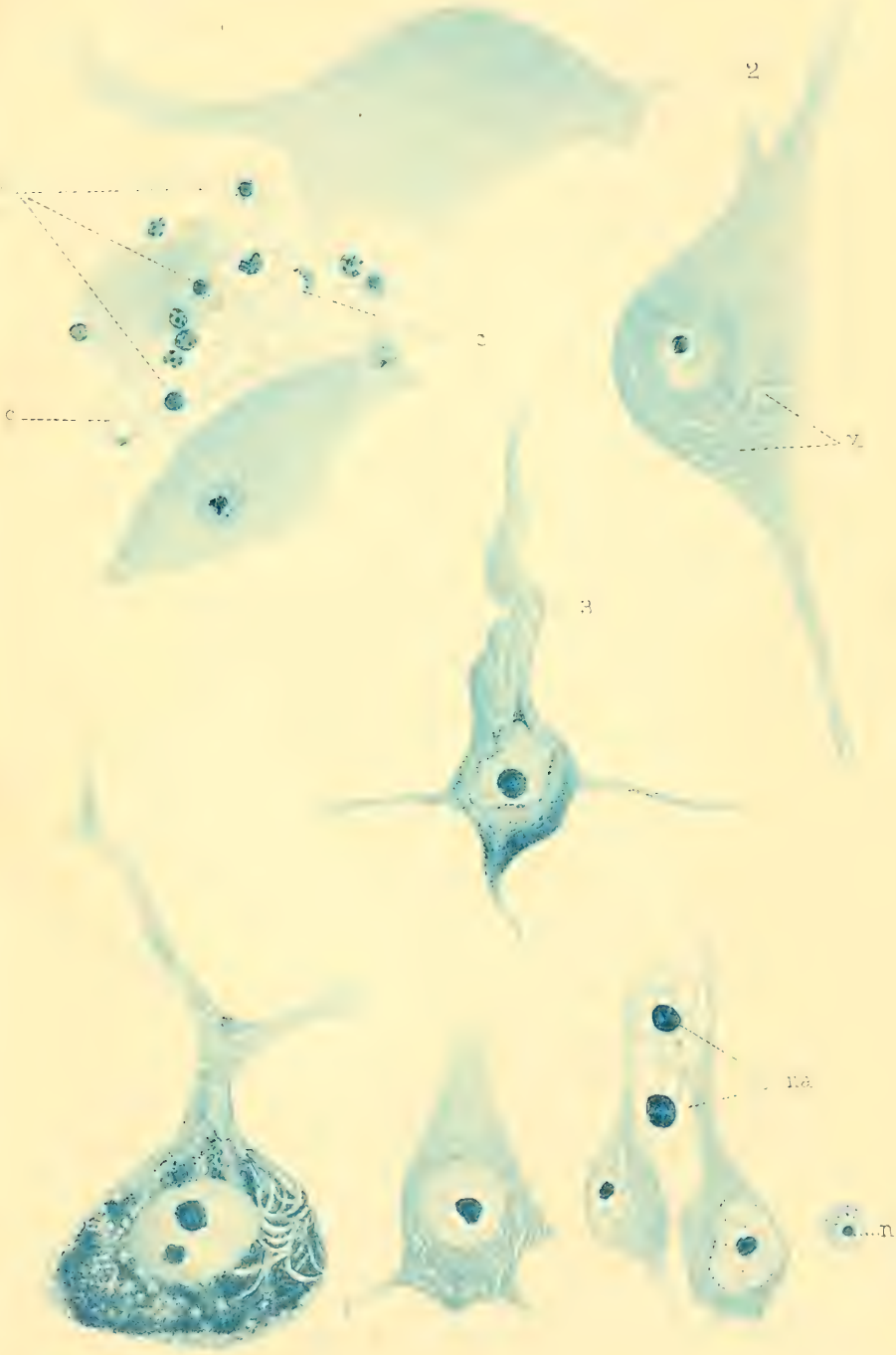
P

P

Fig. 16.

P





Rachmanow del. Constantin lith.

L. Lafontaine, Paris.

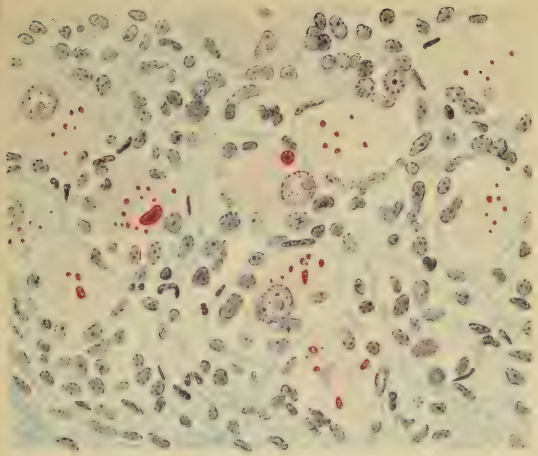


Fig. 1

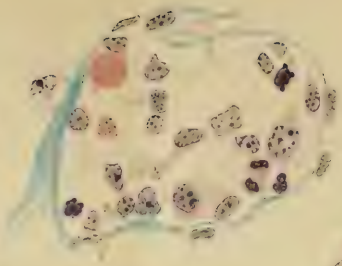


Fig. 4

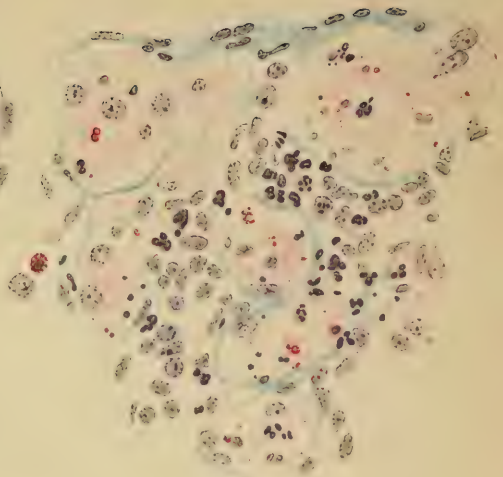


Fig. 3

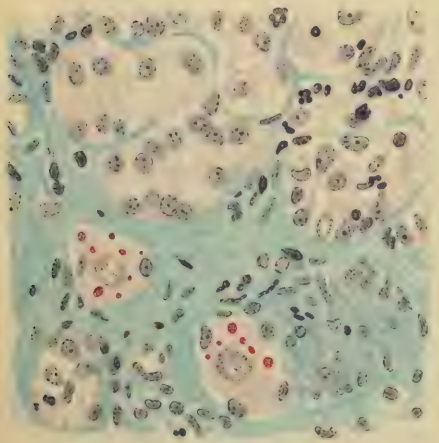


Fig. 2.

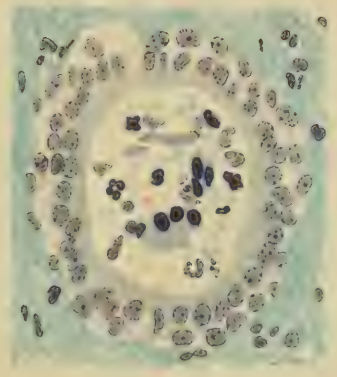


Fig. 5

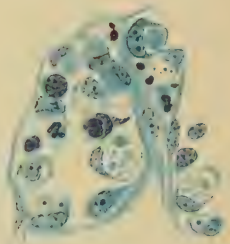


Fig. 6

Constantin del. & Lith.

Imp. L. Lafontaine Paris

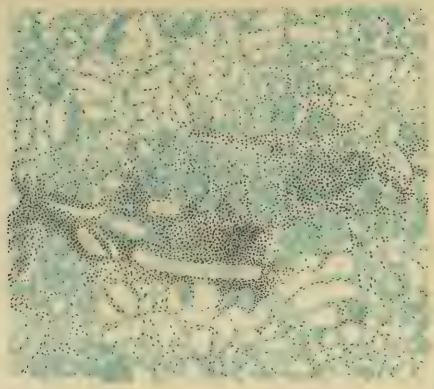


Fig. 7.

Fig. 8

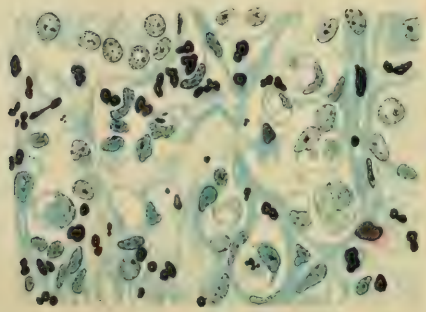
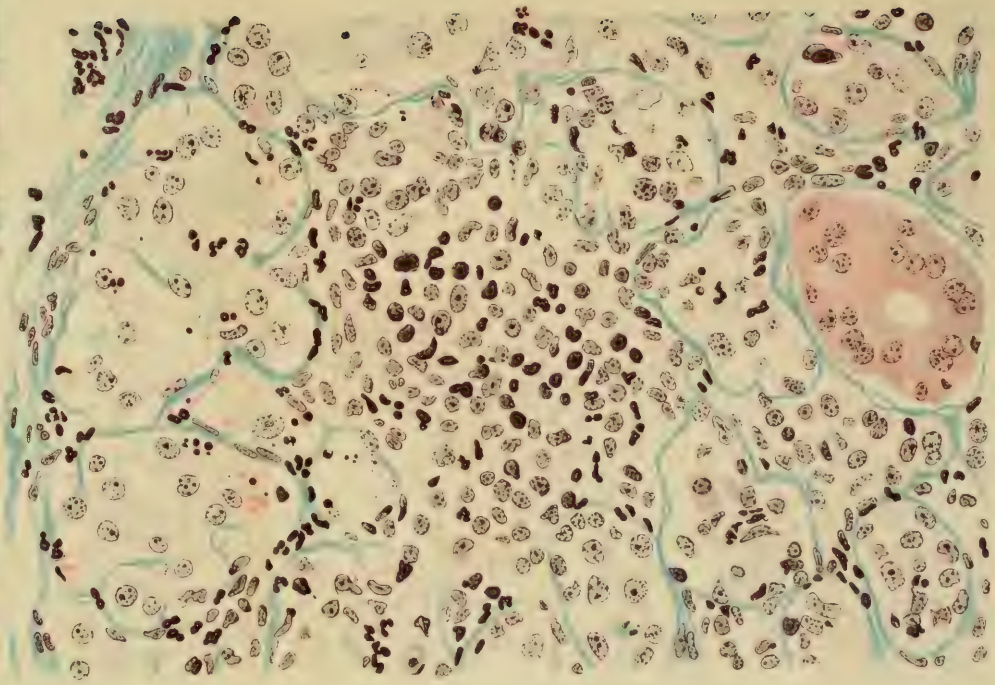
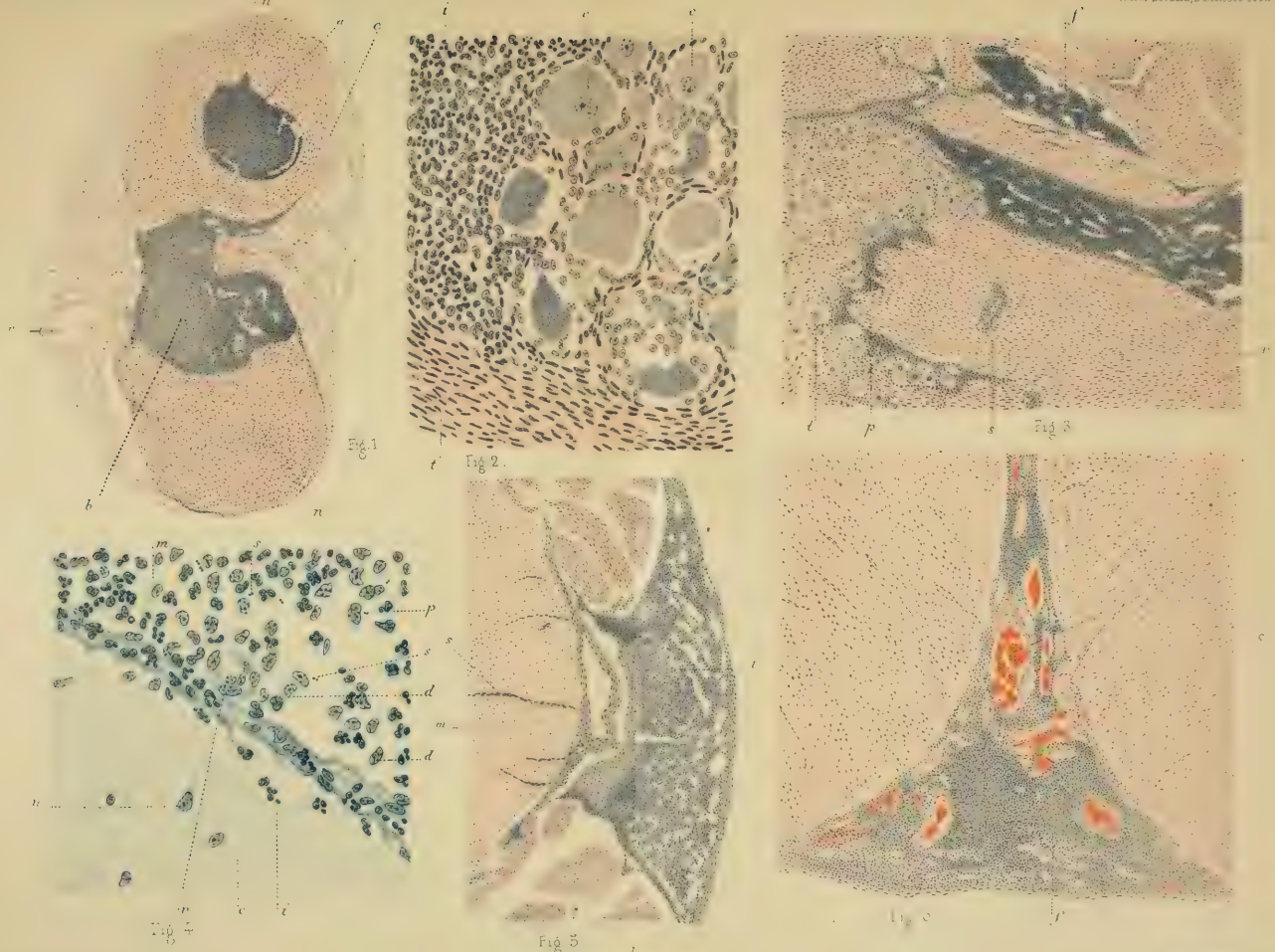


Fig. 9



C. Constantin del. & lith.

Imp. L. Lafontaine, Paris



St. Constantin del. et lith.

Constantin lith.

Imp. L. Lafontaine Paris

Fig. 1

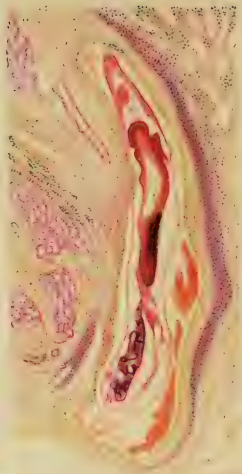


Fig. 2

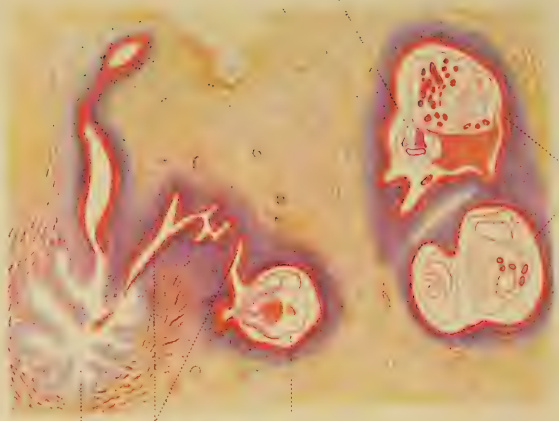


Fig. 5

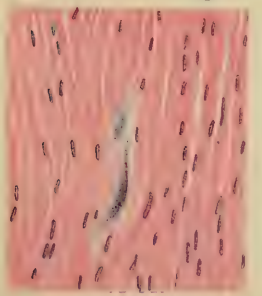


Fig. 3.

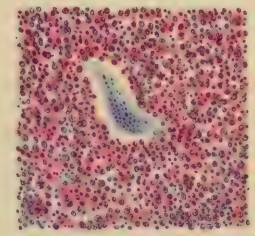


Fig. 4

Fig. 6

C. Constantin del. & lith.

Imp. L. Lafontaine, Paris

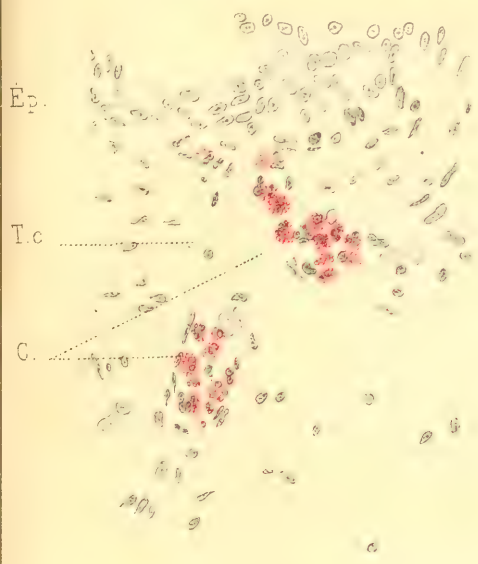


Fig. 1.

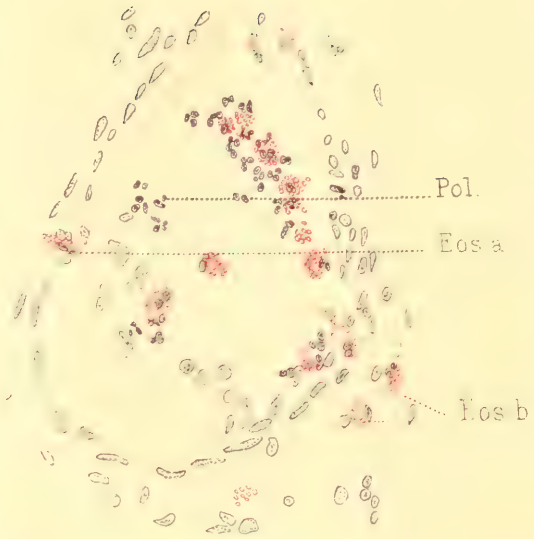


Fig. 2

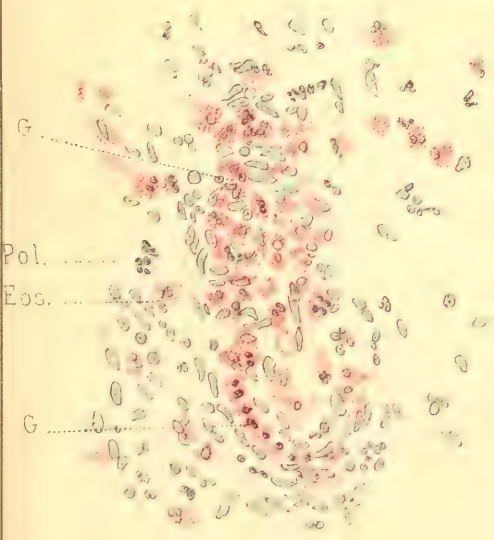


Fig. 3.

Fig. 4

Constantin, del & lith.

Imp. d'Art J. Lafontaine, Paris.

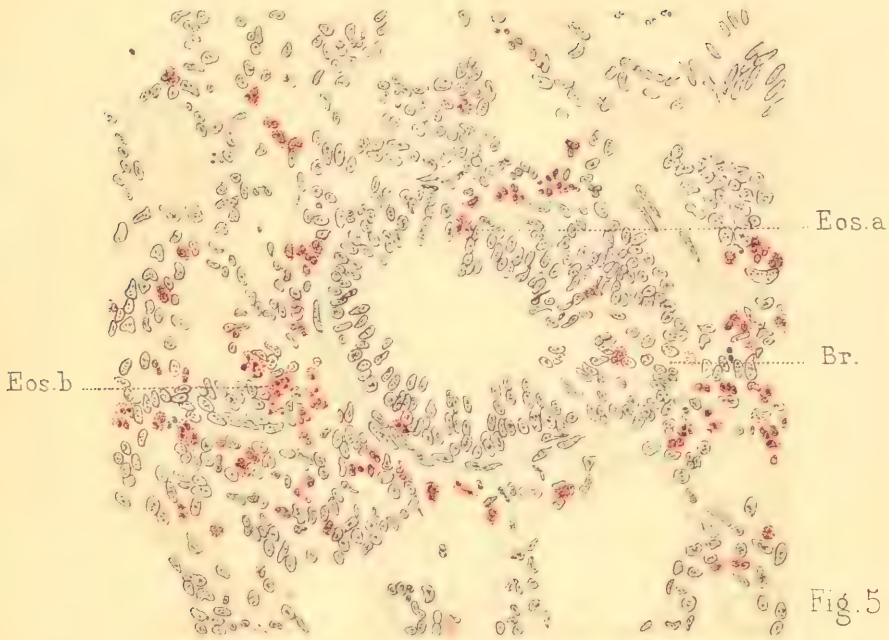


Fig. 5

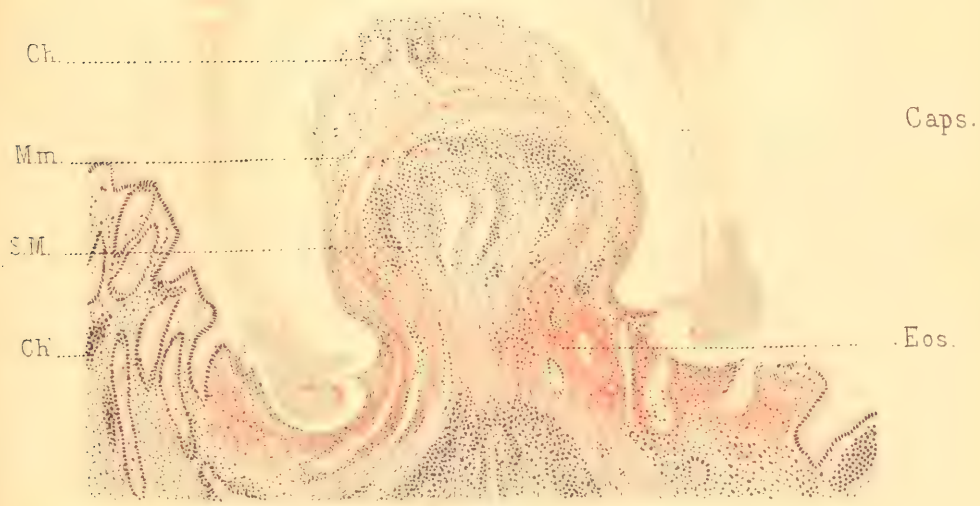
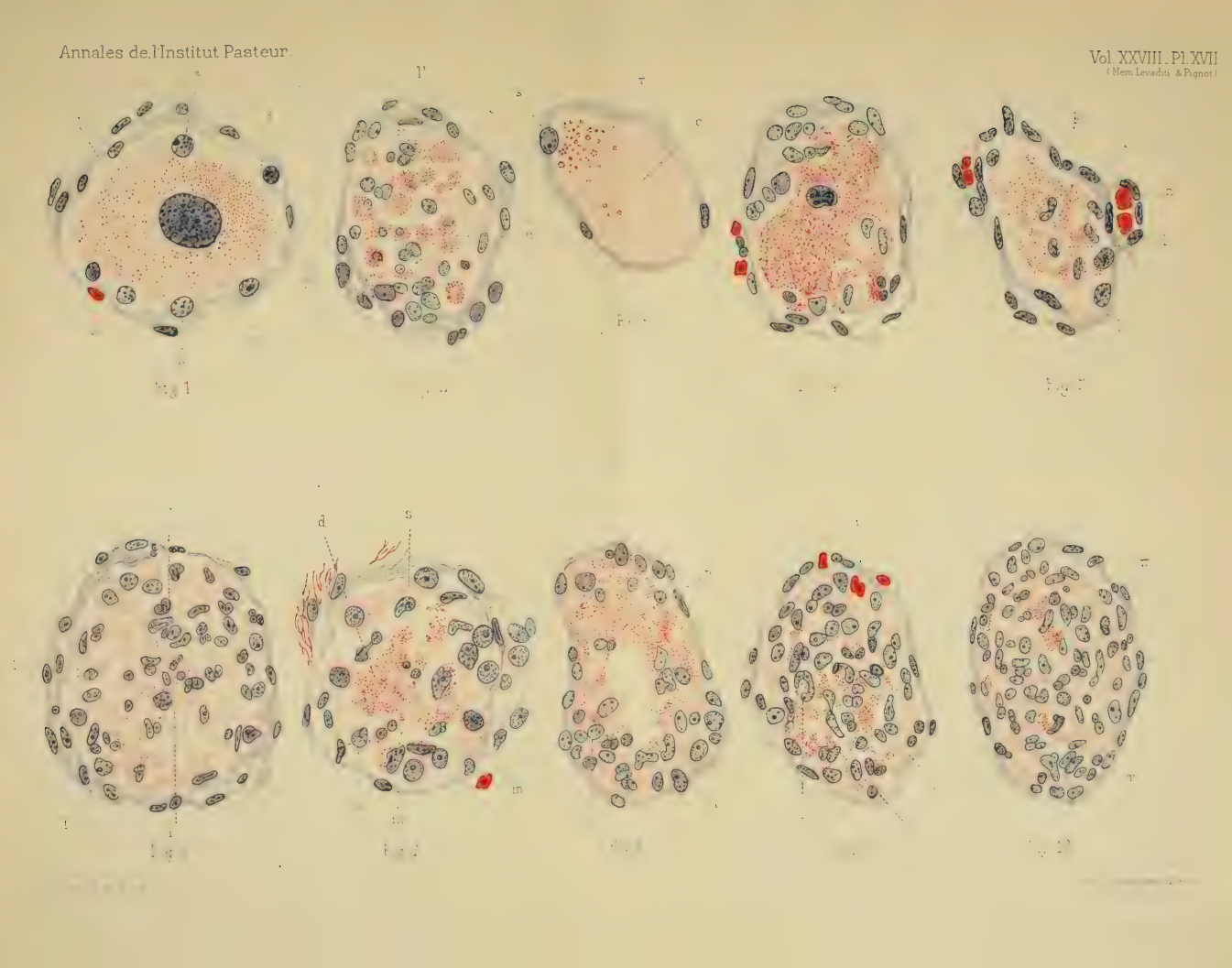


Fig. 6.

Constantin, del & lith. Imp d'Art L. Lafontaine, Paris.


d
s
in

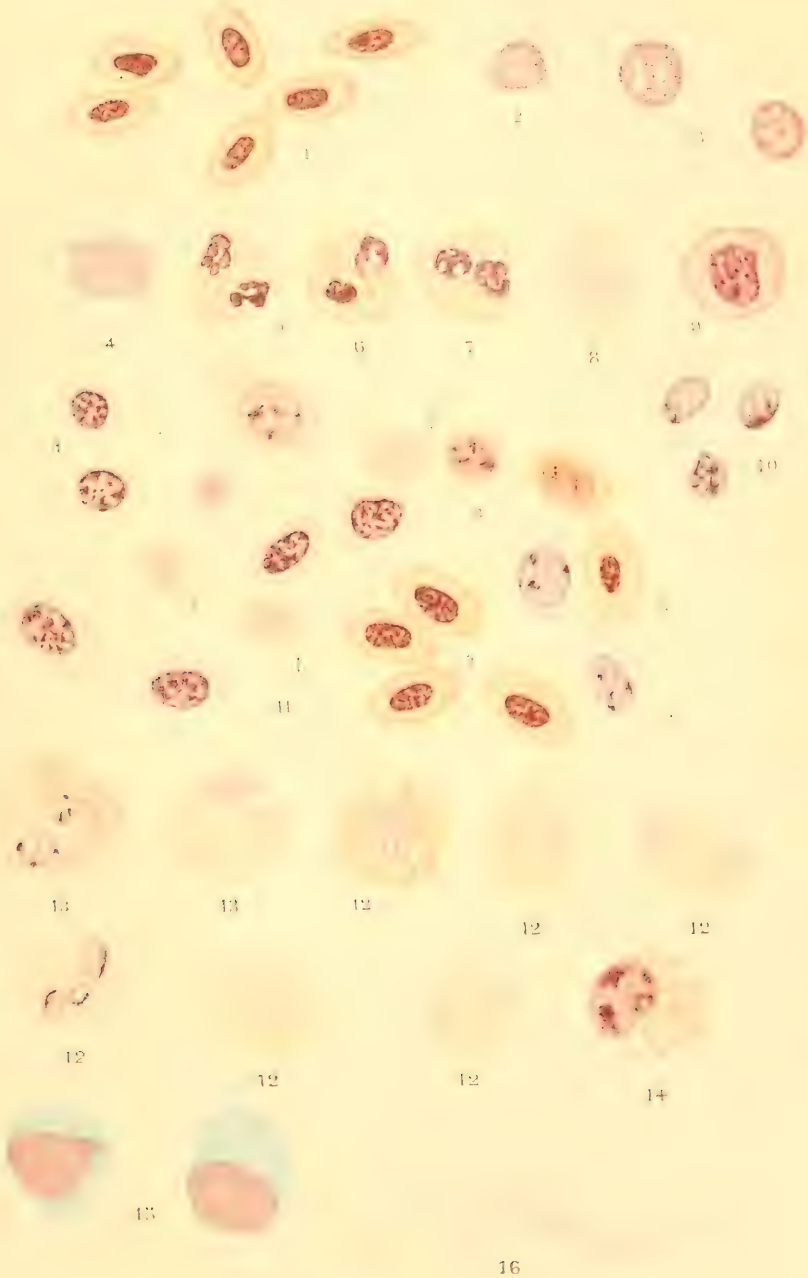

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
13
13
12
12
12
12
12
12
14
15
16

Fig 1

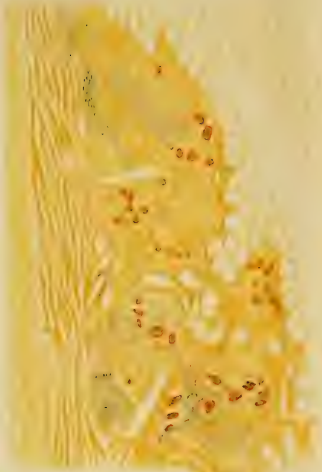


Fig 2

Fig 3

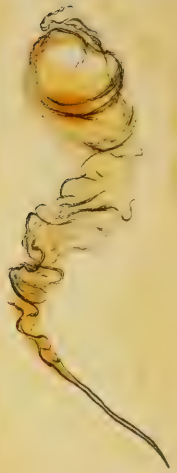


Fig 4

Fig 5

Fig 6

C Constantin & E Budin, ad nat del & lith

Imp d'Art L Lafontaine, Paris

Fig 7

Fig.9

Fig 10

Fig 8

E Budin & C. Constantin ad nat del & lith

Imp d'Art L.Lafontaine, Paris

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

PAR

E. DUCLAUX

COMITÉ DE RÉDACTION

Dr **CALMETTE**, directeur de l'Institut Pasteur de Lille;
Dr **CHANTEMESSE**, professeur à la Faculté de Médecine;
Dr **LAVERAN**, membre de l'Institut de France;
Dr **L. MARTIN**, directeur du service de Sérothérapie;
Pr **METCHNIKOFF**, sous-directeur de l'Institut Pasteur;
Dr **ROUX**, directeur de l'Institut Pasteur;
Dr **VAILLARD**, membre de l'Académie de Médecine.

TOME VINGT-HUITIÈME

1914

AVEC 20 PLANCHES

PARIS

MASSON ET Cie, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, Boulevard Saint-Germain (6e).

A LA MÊME LIBRAIRIE

BULLETIN DE L'INSTITUT PASTEUR. — *Revue et analyses des travaux de bactériologie, médecine, biologie générale, physiologie, chimie biologique dans leurs rapports avec la microbiologie.* Comité de rédaction : Gab. Bertrand, A. Besredka, A. Borrel, C. Pelezenne, A. Marie, F. Mesnil, de l'Institut Pasteur de Paris. Prix de l'abonnement : Paris, Seine et Seine-et-Oise, 24 francs; Départements, 25 fr.; Union postale, 26 francs.

Techniques du diagnostic par la méthode de déviation du Complément, par le Dr P.-F. Armand-Delille. 1 vol. in-8 de vi-200 pages, avec 25 figures dans le texte et une planche hors texte en couleurs, cartonné toile . . 5 fr.

Nouveau Traité de Pathologie générale, publié par Ch. Bouchard, professeur honoraire de pathologie générale à la Faculté de médecine, membre de l'Académie des sciences et de l'Académie de médecine, et G.-H. Roger, professeur de pathologie expérimentale à la Faculté de médecine, membre de l'Académie de médecine, médecin de l'Hôtel-Dieu. 4 vol. gr. in-8, avec figures dans le texte. Relié toile. *En souscription jusqu'à l'apparition du Tome III.* . . . . . 105 fr.

Déjà parus : Tomes I et II. — 2 vol. gr. in-8. Reliés toile. Tome I. 22 fr.
Tome II. . . . . 28 fr.

Nouvelle Pratique médico-chirurgicale illustrée : *Chirurgie, Médecine, Obstétrique, Thérapeutique, Dermatologie, Psychiatrie, Oculistique, Oto-Rhino-Laryngologie, Odontologie, Médecine militaire, Médecine légale, Accidents du travail, Bactériologie clinique, Hygiène, Puériculture, Médications, Régimes, Agents physiques, Formulaire.* Directeurs : E. Brissaud, A. Pinard, P. Reclus, professeur à la Faculté de médecine de Paris. Secrétaire général : Henry Meige. *La Nouvelle pratique médico-chirurgicale illustrée* forme 8 vol. gr. in-8°, reliés maroquin rouge, tête dorée, dos plat, fers spéciaux, comprenant un ensemble de 8.000 pages, avec 2.218 figures dans le texte et 75 planches hors texte en noir et en couleurs.

Prix de l'ouvrage complet avec le premier supplément . . . . . 206 fr.

(*Avec le supplément, relié en 2 volumes : 211 francs.*)

Vient de paraître :

Premier supplément (années 1911-1912), publié par M. A. Couvelaire, Henry Meige et Ch. Lenormant. 1 vol. de 1.880 pages, relié maroquin rouge. . 30 fr.

(*Se vend également relié en 2 volumes : 35 francs.*)

Trypanosomes et Trypanosomiases, par A. Laveran, professeur à l'Institut Pasteur, membre de l'Institut et de l'Académie de médecine, et F. Mesnil, professeur à l'Institut Pasteur. *Deuxième édition entièrement refondue.* 1 vol. gr. in-8, de viii-1.000 pages, avec 198 figures dans le texte et une planche hors texte en couleurs . . . . . 25 fr.

Moustiques et Maladies infectieuses : *Guide pratique pour l'étude des moustiques*, par les Drs Edmond et Etienne Sergent, de l'Institut Pasteur de Paris, avec une préface de E. Roux, membre de l'Institut, *2e édition.* 1 vol. petit in-8, de l'*Encyclopédie des Aide-Mémoire*, avec 43 figures. Broché, 2 fr. 50. Cartonné toile. . . . . 3 fr.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

MBL/WHOI LIBRARY
WH 1969 V